

**EFEITOS DA LECTINA DE *DIOCLEA VIOLACEA* NA LESÃO RENAL  
AGUDA INDUZIDA POR ISQUEMIA/REPERFUSÃO RENAL**

**Flávia Priscila Santos Freitas**

**Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**

**Universidade Federal do Espírito Santo**

**Vitória, Dezembro de 2015**

# **EFEITOS DA LECTINA DE *DIOCLEA VIOLACEA* NA LESÃO RENAL AGUDA INDUZIDA POR ISQUEMIA/REPERFUSÃO RENAL**

Flávia Priscila Santos Freitas

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 22/12/2015 por:

---

Profª Drª Ágata Lages Gava – Orientadora, UFES

---

Prof.Dr. Leonardo dos Santos, UFES

---

Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada, UFC

---

Profª Drª Camille de Moura Ballarini, UFPB

---

Profª Drª Bianca Prandi Campagnaro, UVV

**Universidade Federal do Espírito Santo**

**Vitória, Dezembro de 2015**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por sempre ter me guiado e por ter permitido a conclusão de mais uma importante etapa em minha vida.

Aos meus pais, Manoel e Gilzete, por sempre terem me apoiado em tudo o que eu quis fazer, por não terem medido esforços para me dar uma boa educação e por terem me ensinado desde criança o gosto por aprender e descobrir coisas novas.

Ao Luiz, que esteve ao meu lado nas etapas mais críticas e mais felizes deste trabalho, por compreender minhas ausências, me ouvir, aguentar meu estresse quando algo dava errado, e por sempre me tranquilizar, me fazendo ter a certeza de que no final tudo daria certo.

À minha irmã, Pati, que mesmo estando distante também sempre me apoiou. Obrigada pelo companheirismo, pelos momentos de diversão e por me servir de exemplo de que devemos seguir os nossos sonhos e fazer o que gostamos.

A toda minha família e amigos, que mesmo sem fazer parte do mundo da pesquisa sei que torceram por mim.

Aos professores Vasquez e Silvana, por terem me recebido e acolhido no laboratório desde a época da iniciação científica. Obrigada por todo o suporte, ideias, contribuições e por terem me ensinado tanto em todos esses anos. Admiro muito vocês! Vocês são exemplos a serem seguidos.

À professora Ágata, por ter me acompanhado de perto desde o início. Você foi fundamental para a conclusão deste trabalho. Obrigada por sempre ter me apoiado e estimulado com seu jeito paciente de orientar. Se algo dava errado e eu entrava em desespero ou pensava em desistir, conseguia me acalmar e me fazer enxergar as coisas com mais clareza, mandando sempre “tocar o barco”. Também aprendi muito com você!

Ao professor Benildo e toda a sua equipe, muito obrigada, por extrair e fornecer a lectina, substância alvo deste estudo. Agradeço também ao professor Emilio por estabelecer ponte entre a equipe do LTF e do professor Benildo.

Aos professores e à equipe técnica dos laboratórios multiusuários LHMI e LABIOM, onde parte dos experimentos foi realizada, obrigada por todo o suporte.

Agradeço também ao patologista Rogério, por ter feito as lâminas para a análise histológica. Aos professores Thiago, Camille e Bianca Campagnaro, por todos seus comentários, sempre tão valiosos. Aos demais professores e alunos do PPGCF, por compartilhar ideias, protocolos e sugestões, além de permitir o uso de equipamentos e reagentes de seus laboratórios.

Aos amigos do laboratório, que tornaram esses anos muito mais divertidos. Obrigada pelos momentos felizes, como a hora do café e os happy hours. E também por dividir momentos não tão legais, como quando os experimentos dão errado e o desespero com os prazos acabando. Agradeço também por todas as discussões, que sempre serviram para que eu aprendesse algo novo. Às amigas Ananda, Bianca Rodrigues e Marcella pela amizade e por toda a ajuda com os experimentos. Aos alunos, novos

e antigos, que passaram pela renal: Fred, Gilberto, Lais, Sonila, Raffa, Camilla, Jamila, obrigada por serem sempre tão divertidos e pela ajuda no cuidado com os animais. A Marcos, Fran, Alan, Brunella, Andreia, Thiago, Thaís, Rossana, Bernah e a todas as outras pessoas que passaram pelo laboratório durante o desenvolvimento deste projeto.

*“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância.”*

John F. Kennedy

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1</b>	
Estrutura da lectina de <i>Dioclea violacea</i> .....	30
<b>Figura 2</b>	
Fotografias do procedimento cirúrgico de I/R renal .....	37
<b>Figura 3</b>	
Fotografia do sistema de infusão e aquisição de dados.....	39
<b>Figura 4</b>	
Avaliação da taxa de filtração glomerular nos diferentes grupos estudados .....	47
<b>Figura 5</b>	
Avaliação do fluxo plasmático renal nos diferentes grupos estudados .....	48
<b>Figura 6</b>	
Determinação do fluxo sanguíneo renal nos diferentes grupos estudados .....	49
<b>Figura 7</b>	
Determinação da resistência vascular renal nos diferentes grupos estudados.....	50
<b>Figura 8</b>	
Análise histológica renal nos diferentes grupos estudados.....	53
<b>Figura 9</b>	
Resultado da atividade de mieloperoxidase nos diferentes grupos estudados .....	54
<b>Figura 10</b>	
Produção de ânion superóxido nos diferentes grupos estudados .....	56
<b>Figura 11</b>	
Produção de peróxido de hidrogênio nos diferentes grupos estudados.....	58
<b>Figura 12</b>	
Produção de radical hidroxila e peroxinitrito nos diferentes grupos estudados.....	60
<b>Figura 13</b>	
Produção de óxido nítrico nos diferentes grupos estudados.....	62
<b>Figura 14</b>	
Análise da apoptose nos diferentes grupos estudados .....	64
<b>Tabela 1</b>	
Classificação da LRA pelo critério RIFLE .....	16
<b>Tabela 2</b>	
Classificação da LRA pelo critério AKIN.....	17

**Tabela 3**

Classificação da LRA pelo critério KDIGO .....17

**Tabela 4**

Funções das lectinas nos organismos.....28

**Tabela 5**

Resultados dos parâmetros bioquímicos nos diferentes grupos estudados.....51

**Tabela 6**

Sumário de resultados.....75



## LISTA DE ABREVIATURAS

**LRA:** Lesão renal aguda

**TFG:** Taxa de filtração glomerular

**UTI:** Unidade de terapia intensiva

**ICAM-1:** Molécula de adesão intercelular-1

**VCAM-1:** Molécula de adesão celular vascular-1

**TNF- $\alpha$ :** Fator de necrose tumoral alfa

**IL-1:** Interleucina-1

**IL-6:** Interleucina-6

**IL-2:** Interleucina-2

**IFN- $\gamma$ :** Interferon gama

**TGF- $\beta$ :** Fator de transformação do crescimento beta

**iNOS:** Óxido nítrico sintase induzível

**NO:** Óxido nítrico

**eNOS:** Óxido nítrico sintase endotelial

**Ang II:** Angiotensina II

**I/R:** Isquemia/reperfusão

**IL-10:** Interleucina-10

**IL-4:** Interleucina-4

**ConA:** Lectina de *Canavalia ensiformis*, Concavalina A

**Dvl:** Lectina de *Dioclea violacea*

**ConBr:** Lectina de *Canavalia brasiliensis*

**DGui:** Lectina de *Dioclea guianensis*

**RVR:** Resistência vascular renal

**CTNBIO:** Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

**CEUA:** Comitê de Ética no Uso de Animais

**PAH:** Paraaminohipurato

**FPR:** Fluxo plasmático renal

**FSR:** Fluxo sanguíneo renal

**PAM:** Pressão arterial média

**MPO:** Mieloperoxidase

**HTAB:** Brometo de Hexa-1,6-bis-deciltrimetilamônio

**EDTA:** Ácido etilenodiaminotetracético

**PBS:** Tampão fosfato salino

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**SFB:** Soro fetal bovino

**DHE:** Dihidroetídio

**DCF-DA:** Diacetato de 2'7'diclorofluoresceína

**•O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Ânion superóxido

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrogênio

**•OH:** Radical hidroxila

**ONOO<sup>-</sup>:** ânion peroxinitrito

**HPF:** Hidroxifenilfluoresceína

**DAF-2/DA:** 4,5-diaminofluoresceína-2/diacetato

**IP:** Iodeto de propídio

**EPM:** Erro padrão da média

**u.a.:** Unidades arbitrárias

**U.A.:** Unidade de atividade

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	13
<b>ABSTRACT</b>	14
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	15
1.1. LESÃO RENAL AGUDA	15
1.1.1. EPIDEMIOLOGIA	18
1.1.2. FISIOPATOLOGIA	19
1.1.3. MODELOS EXPERIMENTAIS DE LRA	22
1.1.4. MANEJO CLÍNICO DA LRA	25
1.2. LECTINAS	26
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	32
<b>3. OBJETIVOS</b>	33
3.1. OBJETIVOS GERAIS	33
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
<b>4. METODOLOGIA</b>	34
4.1. LECTINA	34
4.2. ANIMAIS EXPERIMENTAIS	34
4.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS	35
4.4. TRATAMENTO	35
4.5. INDUÇÃO DA LESÃO RENAL AGUDA	36
4.6. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	38
4.7. PROTOCOLO DE FUNÇÃO RENAL	38
4.8. HISTOLOGIA RENAL	42
4.9. ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE	42
4.10. ISOLAMENTO DE CÉLULAS RENAIAS	43
4.11. DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	43
4.12. DETECÇÃO DE ESPÉCIES ALTAMENTE REATIVAS DE OXIGÊNIO	44
4.13. DETECÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	45
4.14. AVALIAÇÃO DA APOPTOSE	46
4.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
<b>5. RESULTADOS</b>	47
5.1. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL	47
5.1.1. TAXA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR	47

5.1.2. FLUXO PLASMÁTICO RENAL .....	48
5.1.3. FLUXO SANGUÍNEO RENAL .....	49
5.1.4. RESISTÊNCIA VASCULAR RENAL.....	50
5.2. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS .....	51
5.3. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA .....	52
5.4. ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE .....	54
5.5. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO .....	55
5.5.1. ÂNION SUPERÓXIDO.....	55
5.5.2. PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO .....	57
5.5.3. RADICAL HIDROXILA E ÂNION PEROXINITRITO.....	59
5.5.4. ÓXIDO NÍTRICO.....	61
5.6. APOPTOSE .....	63
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>7. SUMÁRIO DE RESULTADOS.....</b>	<b>75</b>
<b>8. CONCLUSÃO .....</b>	<b>76</b>
<b>9. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>77</b>

## RESUMO

A lesão renal aguda (LRA) é caracterizada por um rápido e potencialmente reversível declínio na função renal; no entanto, o tratamento atual da LRA não é específico e está associado a cuidados de suporte limitados. Considerando a necessidade de novas abordagens terapêuticas, acreditamos que a lectina de *Dioclea violacea* (Dvl), por possuir propriedades anti-inflamatórias, pode ser benéfica para o tratamento da LRA induzida por isquemia/reperfusão renal (I/R).

Dvl (1 ml/kg, i.v.) ou veículo (100 µL) foram administrados a ratos Wistar anteriormente à indução da isquemia renal bilateral (45 minutos). Após 24 horas de reperfusão, *osclearances* de inulina e paraminohipurato foram realizados para determinar a taxa de filtração glomerular (TFG), o fluxo plasmático renal (FPR), o fluxo sanguíneo renal (FSR) e a resistência vascular renal (RVR). Ureia plasmática, creatinina plasmática e proteinúria foram analisadas por espectrofotometria. A inflamação renal foi medida usando a atividade de mieloperoxidase (MPO). Cortes do rim foram corados com hematoxilina-eosina para avaliação de alterações morfológicas. A produção de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, peroxinitrito, radical hidroxil, óxido nítrico e apoptose nos rins foram avaliados por citometria de fluxo.

A I/R resultou em TFG, FPR e FSR diminuídos e aumentou a RVR, uremia e creatinina plasmática; porém, estes parâmetros foram melhorados em ratos que receberam Dvl. Não houve diferenças na proteinúria dos diferentes grupos. As alterações histomorfológicas induzidas pela LRA, como dilatação tubular, necrose tubular e deposição de material protéico, foram atenuadas pela administração de Dvl. O tratamento com Dvl resultou em diminuição na atividade de MPO, estresse oxidativo e apoptose nos ratos submetidos à I/R.

Nossos dados mostraram que a Dvl possui um efeito protetor no rim, melhorando a função renal após a lesão por I/R, provavelmente devido à redução do recrutamento de neutrófilos e do estresse oxidativo. Estes resultados indicam que a Dvl pode ser considerada como uma nova abordagem terapêutica para a LRA induzida por I/R.

## ABSTRACT

Acute kidney injury (AKI) is characterized by a rapid and potentially reversible decline in renal function; however, the current management for AKI is nonspecific and associated with limited supportive care. Considering the need for more novel therapeutic approaches, we believe that lectins from *Dioclea violacea* (Dvl), based on their anti-inflammatory properties, could be beneficial for the treatment of AKI induced by renal ischemia/reperfusion (I/R).

Dvl (1 mg/kg, i.v.) or vehicle (100  $\mu$ L) was administered to Wistar rats prior to the induction of bilateral renal ischemia (45 min). Following 24 hours of reperfusion, inulin and para-aminohippurate (PAH) clearances were performed to determine glomerular filtration rate (GFR), renal plasma flow (RPF), renal blood flow (RBF) and renal vascular resistance (RVR). Plasma urea, plasma creatinine and urine protein were analyzed by spectrophotometry. Renal inflammation was assessed using Myeloperoxidase (MPO) activity. Kidney sections were stained with hematoxylin-eosin to evaluate morphological changes. Intracellular superoxide anions, hydrogen peroxide, peroxynitrite, hydroxyl radical, nitric oxide and apoptosis production in the kidneys were analyzed using flow cytometry.

I/R resulted in diminished GFR, RPF, RBF, and increased RVR plasma urea and plasma creatinine; however, these changes were ameliorated in rats receiving Dvl. There were no differences in urine protein levels between groups. AKI-induced histomorphological changes, such as tubular dilatation, tubular necrosis and proteinaceous casts, were attenuated by Dvl administration. Treatment with Dvl resulted in diminished renal MPO activity, oxidative stress and apoptosis in rats submitted to I/R.

Our data reveal that Dvl has a protective effect in the kidney, improving renal function after IR injury, probably by reducing neutrophil recruitment and oxidative stress. These results indicate that Dvl can be considered a new therapeutic approach for AKI-induced kidney injury.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. LESÃO RENAL AGUDA

A lesão renal aguda (LRA) é caracterizada por um rápido e potencialmente reversível declínio na função renal, incluindo rápida diminuição na taxa de filtração glomerular (TFG) e retenção de resíduos nitrogenados em um período de horas ou dias (SINGH et al., 2012). A LRA resulta na incapacidade dos rins de exercerem corretamente suas funções, incluindo a excreção de substâncias endógenas e exógenas, a manutenção do equilíbrio hidro-eletrolítico, o controle dos volumes dos compartimentos corporais e da pressão arterial, o controle da osmolaridade, o equilíbrio ácido-base e a manutenção das funções endócrinas (BARROS et al., 2013).

Por existirem na literatura diversas definições de “insuficiência renal aguda”, o termo “lesão renal aguda”, tradução do inglês “*acute kidney injury*”, tem sido utilizado atualmente como nomenclatura preferível para esta síndrome (MOORE; BELLOMO; NICHOL, 2012). A terminologia “injúria renal aguda” também tem se tornado comum no Brasil, principalmente na área de terapia intensiva (BARROS et al., 2013; PONCE et al., 2011). A nova definição para a LRA em pacientes é caracterizada pelo aumento da creatinina sérica maior que 0,3 mg/dL em 48 horas, ou aumento da creatinina sérica em mais de 1,5 vezes o valor basal em menos de 7 dias, ou volume urinário menor que 0,5 mL/kg/h em 6 horas (“KDIGO Clinical Practices Guideline for Acute Kidney Injury”, 2012).

A LRA pode levar a um dano contínuo do rim, portando existem critérios de classificação para os diferentes estágios da doença. Os critérios RIFLE (do acrônimo *Risk, Injury, Failure, Loss and End-stage*) consistem em cinco níveis: risco, lesão,

falência, perda de função renal e estágio final da insuficiência renal (Tabela 1). Esse sistema de classificação incorpora alterações na função renal a partir dos níveis basais e, apesar de ser uma classificação mais antiga, ainda é bastante utilizada e clinicamente aplicável. O critério AKIN (*Acute Kidney Injury Networks*) é baseado no RIFLE, e estratifica a LRA em três diferentes estágios (Tabela 2) (MOORE; BELLOMO; NICHOL, 2012). O mais recente método de classificação, e também o mais utilizado, o KDIGO (*Kidney Disease Improving Global Outcomes*) combina os critérios RIFLE e AKIN com pequenas modificações (Tabela 3) (“KDIGO Clinical Practices Guideline for Acute Kidney Injury”, 2012).

**Tabela 1:** Classificação da LRA de acordo com o critério RIFLE. Adaptado de Moore, 2012.

<b>Estágio</b>	<b>Creatinina Plasmática</b>	<b>Produção de Urina</b>
<b>Risco</b>	Creatinina plasmática >1,5 vezes o basal	<0,5 mL/kg/h por 6-12 horas
<b>Lesão</b>	Creatinina plasmática >2 vezes o basal	<0,5 mL/kg/h por ≥12 horas
<b>Insuficiência</b>	Creatinina plasmática >3 vezes o basal ou creatinina plasmática >4 mg/dL o basal com aumento agudo ≥0,5 mg/dL	<0,3 mL/kg/h por ≥24 horas ou anúria por ≥12 horas
<b>Perda</b>	Perda completa da função renal >4 semanas	
<b>Estágio final</b>	Estágio final da doença renal >3 meses	



**Tabela 2:** Classificação da LRA de acordo com o critério AKIN. Adaptado de Moore, 2012.

<b>Estágio</b>	<b>Creatinina Plasmática</b>	<b>Produção de Urina</b>
<b>1</b>	1,5 a 1,9 vezes o basal ou aumento $\geq 0,3$ mg/dL	$<0,5$ mL/kg/h por 6-12 horas
<b>2</b>	2,0 a 2,9 vezes o basal	$<0,5$ mL/kg/h por $\geq 12$ horas
<b>3</b>	3,0 vezes o basal ou aumento $\geq 0,4$ mg/dL	$<0,3$ mL/kg/h por $\geq 24$ horas ou anúria por $\geq 12$ horas

**Tabela 3:** Classificação da LRA de acordo com o critério KDIGO. Adaptado de “KDIGO Clinical Practices Guideline for Acute Kidney Injury”, 2012.

<b>Estágio</b>	<b>Creatinina plasmática</b>	<b>Produção de urina</b>
<b>1</b>	1,5 a 1,9 vezes o basal ou aumento $\geq 0,3$ mg/dL	$<0,5$ mL/kg/h por 6-12 horas
<b>2</b>	2,0 a 2,9 vezes o basal	$<0,5$ mL/kg/h por $\geq 12$ horas
<b>3</b>	3,0 vezes o basal; ou aumento $\geq 0,4$ mg/dL; ou se $<18$ anos, TFG $\leq 35$ ml/min/1,73 m <sup>2</sup> ; ou início da terapia de substituição renal	$<0,3$ mL/kg/h por $\geq 24$ horas ou anúria por $\geq 12$ horas

As causas da LRA têm sido tradicionalmente divididas em pré-renal, renal e pós-renal. A LRA pré-renal ocorre em consequência da diminuição da perfusão renal, que leva à redução na TFG. Entre as principais causas da LRA pré-renal podemos destacar: sepse, doenças graves, choque circulatório, queimaduras, trauma e cirurgias cardíacas. A LRA renal, também chamada de LRA intrínseca ou estrutural, ocorre quando existe um dano nas estruturas do néfron, como glomérulos, túbulos, vasos ou interstício. Entre as causas da LRA renal se destacam a necrose tubular

aguda, nefrite túbulo-intersticial, pielonefrite, glomerulonefrite e necrose cortical. Muitas vezes a LRA pré-renal provoca isquemia renal e leva ao desenvolvimento da LRA renal. Portanto, a LRA pré-renal e LRA renal podem ocorrer de maneira contínua a um mesmo processo fisiopatológico, sendo juntas responsáveis por 75% das causas de LRA. Por fim, a LRA pós-renal ou obstrutiva ocorre como resultado de obstrução do fluxo urinário, como cálculos renais, lesões por cirurgias nos ureteres, coágulos, tumores e fibrose retroperitoneal (“KDIGO Clinical Practices Guideline for Acute Kidney Injury”, 2012; MOORE; BELLOMO; NICHOL, 2012; SINGH et al., 2012).

#### 1.1.1. EPIDEMIOLOGIA

Há tempos a LRA tem sido descrita como uma grave síndrome. Durante a Primeira Guerra Mundial foi feita uma das primeiras descrições detalhadas da doença, que era muito comum em soldados, como consequência da rabdomiólise (DUNN; MCNEE, 1917). Em 1941, durante a Segunda Guerra Mundial, a fisiopatologia da LRA foi novamente descrita, desta vez de forma mais completa, estando associada a traumas musculares (BYWATERS; BEALL, 1941). A partir daí, inúmeros relatos sobre a LRA surgiram na literatura, ocorrendo devido a diferentes causas.

A LRA é uma complicação comum em pacientes críticos em internação, estando associada com um aumento do risco de morte e com tempo prolongado de internação em unidades de terapia intensiva (UTIs), (MOORE; BELLOMO; NICHOL, 2012). Devido à ausência, durante muito tempo, de métodos claros para definição da LRA, a sua descrição epidemiológica tem sido limitada. Alguns trabalhos mostram variações na mortalidade, tempo de internação e custos dependendo do critério utilizado para definir a LRA (CHERTOW et al., 2005). Segundo revisão feita por Ricci

e Ronco, a LRA possui incidência de 0,25% na população geral, de 18% em pacientes em leitos hospitalares e de 30 a 60% em pacientes em estado crítico (RICCI; RONCO, 2012). Além disso, foi observado que a presença da LRA aumenta o índice de mortalidade em pacientes internados em UTI (28,8% vs. 8,1% em pacientes sem LRA) e aumento do tempo de internação em UTI (média de 7 dias vs. 3 dias em pacientes sem LRA) (PICCINNI et al., 2011).

No Brasil, há poucos dados sobre a epidemiologia da LRA, porém observa-se que a doença atinge principalmente pacientes com comorbidades e enfermidades graves, especialmente durante o período de internação hospitalar (CERQUEIRA; TAVARES; MACHADO, 2014). Um estudo realizado no Hospital Escola do município de São Paulo entre 2005 e 2006 constatou que 76% dos pacientes submetidos ao tratamento dialítico de hemodiálise nas UTIs apresentavam LRA (SECCO; CASTILHO, 2007).

A LRA, além de levar a danos significativos para milhões de pacientes, possui também um grande impacto econômico para a sociedade devido ao aumento do tempo de internação dos pacientes, implicando em um aumento de recursos utilizados e gerando de custos mais elevados (MOORE; BELLOMO; NICHOL, 2012; TÖGEL; WESTENFELDER, 2014).

#### 1.1.2. FISIOPATOLOGIA

A LRA é um processo multifatorial complexo, que ocorre principalmente como resultado da redução dos níveis de oxigênio nos rins devido à diminuição do fluxo sanguíneo renal. Entre as principais consequências, podemos destacar a depleção de ATP, acúmulo intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  e espécies reativas de oxigênio, infiltração de

células inflamatórias, produção de citocinas pró-inflamatórias e ativação de vias apoptóticas (ZAHARAN et al., 2015).

A depleção de ATP ocorre como resultado da diminuição dos níveis de oxigênio no tecido renal, desencadeando uma série de cascatas bioquímicas que resultam em dano e morte celular. A privação de oxigênio atinge principalmente a produção do ATP pelas mitocôndrias, portanto, estruturas que dependem predominantemente do ATP mitocondrial, como os túbulos contorcidos proximais, são mais sensíveis à lesão renal do que outros segmentos do néfron (WEINBERG, 1991). Além disso, a diminuição da produção de ATP prejudica a atividade da bomba  $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPase}$ , responsável por retirar o  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico em excesso, levando ao acúmulo deste íon no citoplasma. Este íon  $\text{Ca}^{2+}$  ativa fosfolipases e proteases, e aumenta ainda mais a permeabilidade da membrana, com consequente influxo maior de  $\text{Ca}^{2+}$  para os compartimentos citoplasmáticos e mitocondriais, levando a lesão celular irreversível (TUCCI JR. et al., 2005).

Adicionalmente à lesão renal ocasionada pela diminuição da oferta de oxigênio, quando o fluxo sanguíneo é normalizado, ocorre um aumento da produção de radicais livres que resulta em lesão dos rins via peroxidação da membrana lipídica e danos às proteínas e ao DNA, contribuindo para a apoptose e morte celular. Além deste fato, na LRA ocorre um *down regulation* do sistema de enzimas antioxidantes, como catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, o que pode ser responsável pelo aumento da lesão renal na LRA (MALEK; NEMATBAKHSH, 2015). Mediadores inflamatórios e moléculas de adesão como molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), e selectinas também atuam na LRA, recrutando leucócitos e estimulando a infiltração de neutrófilos para o tecido renal. Estas moléculas também levam a um aumento da interação entre leucócitos e células endoteliais, que pode promover danos às

mesmas, agravando as consequências da redução do fluxo sanguíneo (HAGAR; ABD EL TAWAB, 2012; MALEK; NEMATBAKHSH, 2015).

A inflamação que acontece durante a LRA está envolvida em mais danos renais. No início da LRA, inicia-se um aumento de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa ( $\text{TNF-}\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6), cuja produção é induzida pelo infiltrado mononuclear e pelas células endoteliais. Também ocorre um grande aumento da síntese de leucotrienos e da atividade da ciclooxigenase (FEITOZA et al., 2008; MALEK; NEMATBAKHSH, 2015). Outras citocinas inflamatórias, como interleucina-2 (IL-2), interferon gama ( $\text{INF-}\gamma$ ) e fator de transformação do crescimento beta ( $\text{TGF-}\beta$ ) também se apresentam aumentados na LRA, especialmente após a sua fase inicial (CAVALCANTI, 1997).

Tanto a inflamação quanto a fragmentação do DNA estão relacionados ao aumento da apoptose na LRA, que pode ocorrer de duas formas. Pela via intrínseca, estresses intra ou extracelulares geram sinais que interagem com membros anti ou pró-apotóticos da mitocôndria, reduzindo a permeabilidade da membrana e levando à liberação do citocromo c e outros fatores indutores de apoptose ativando as caspases. Pela via extrínseca, a ligação de fatores específicos, como o  $\text{TNF-}\alpha$ , à superfície celular ativa a cascata de caspases, levando à morte celular (PRICE; SAFIRSTEIN; MEGYESI, 2009; SABBAHY; VAIDYA, 2011).

Além disso, a LRA causada por isquemia/reperfusão renal aumenta a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Estudos demonstraram que o aumento da síntese de NO através da iNOS possui um efeito desfavorável sobre a LRA, agravando ainda mais a doença (KORKMAZ; KOLANKAYA, 2013; MALEK; NEMATBAKHSH, 2015).

Outra via ativada pela LRA é o sistema renina angiotensina (SRA), levando à elevação da angiotensina II (ang II). A ang II provoca constrição dos vasos renais,

elevação do estresse oxidativo e indução da apoptose, piorando a lesão renal (HAMMAD; AL-SALAM; LUBBAD, 2013; KONTOGIANNIS; BURNS, 1998; MALEK; NEMATBAKHS, 2015).

### 1.1.3. MODELOS EXPERIMENTAIS DE LRA

Com a finalidade de entender melhor a fisiopatologia da LRA, diversos modelos animais foram desenvolvidos pelos pesquisadores ao longo do tempo. O desenvolvimento destes modelos experimentais permite a realização de experimentos que esclarecem os mecanismos envolvidos na doença e a pesquisa de novas formas de tratamento (SINGH et al., 2012).

O modelo de LRA induzido pelo glicerol consiste na administração intramuscular de glicerol seguida da privação de água e comida por 24 horas. Neste modelo, o músculo esquelético é rompido pelo glicerol, sendo utilizado para mimetizar a LRA induzida pela rabdomiólise em humanos. Ele é caracterizado por mioglobinúria, necrose tubular e vasoconstrição renal (NISHIDA et al., 2015; SINGH et al., 2012).

Outra causa comum da LRA em humanos é a induzida pelo tratamento com o antibiótico gentamicina (NACHTIGALL et al., 2014). Experimentalmente, a gentamicina na dose de 100 mg/kg aplicada por via intraperitoneal durante 5 dias é a forma mais usual de indução da LRA provocada pela gentamicina. A patogênese da nefrotoxicidade neste modelo inclui aumento do estresse oxidativo, alteração do sistema de defesa anti-oxidante, inibição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, aumento da permeabilidade da mitocôndria e ativação do SRA (SINGH et al., 2012).

O quimioterápico cisplatina é mais uma droga cujo tratamento pode causar LRA em grande parte dos pacientes (SONIA et al., 2015). Existem vários mecanismos que contribuem para o desenvolvimento da nefropatia após exposição à cisplatina, entre

eles podemos citar a apoptose e necrose de células tubulares, inflamação, aumento da produção de ROS, sobrecarga de cálcio, ativação de fosfolipases, depleção da glutathione reduzida, inibição da cadeia respiratória na mitocôndria, aumento da porosidade da mitocôndria e depleção do ATP. Experimentalmente, a aplicação de uma dose única de 100 mg/kg de cisplatina por via intraperitoneal é a forma mais comum de indução da LRA causada por cisplatina (SINGH et al., 2012).

Outro modelo muito utilizado experimentalmente é a LRA induzida por radiocontraste. A incidência de nefropatia induzida por contraste é maior quando o paciente apresenta condições específicas ao receber o contraste, como idade avançada, doenças cardiovasculares, diabetes ou insuficiência renal pré-existente (SILVER et al., 2015). Por este motivo, neste modelo experimental, o meio de contraste é administrado por via intraperitoneal ou intravenosa em animais que já apresentem alguma destas condições. A lesão renal causada por meios de radiocontraste envolve a geração de radicais livres, mediadores inflamatórios, alterações no sistema anti-oxidante e desenvolvimento de apoptose (SINGH et al., 2012).

A LRA também pode ser induzida experimentalmente por anti-inflamatórios não esteroidais, como acetaminofeno e diclofenaco. Um dos efeitos colaterais da administração destes medicamentos é o dano à função renal, sendo utilizada em animais para que este efeito seja obtido (EFRATI et al., 2007; GHOSH et al., 2010). Outras substâncias, como urânio, mercúrio, dicromato de potássio e ácido fólico também são utilizadas experimentalmente para a indução da LRA (SINGH et al., 2012).

Para simular a LRA causada por septicemia, o modelo mais comumente utilizado é o de sepse induzida pela ligadura e punção do ceco. Desta forma, o conteúdo fecal se dispersa no peritônio com consequente bacteremia e sepse, seguida da lesão renal.

Este modelo possui um perfil de citocinas inflamatórias semelhante ao que ocorre na LRA induzida por septicemia em humanos (DOI et al., 2009).

Porém, entre todas as técnicas experimentais que mimetizam a LRA, a mais comumente empregada é a cirurgia de isquemia/reperfusão renal (I/R). Neste modelo o fluxo sanguíneo da artéria renal é interrompido por um tempo determinado, seguida pela liberação do fluxo para que ocorra a reperfusão do rim. Este é o modelo animal mais adequado para simular as alterações hemodinâmicas que ocorrem na função renal em humanos com LRA (SINGH et al., 2012).

Diferentes trabalhos na literatura mostram algumas variações nesta técnica, reproduzindo formas mais brandas ou mais severas da LRA. A oclusão da artéria renal pode ser bilateral (BHALODIA et al., 2009) ou unilateral seguida de nefrectomia contralateral (MATTHIJSEN et al., 2007), e o tempo de interrupção do fluxo sanguíneo pode variar (SINGH et al., 2012). A lesão renal por I/R também pode ser induzida por oclusão da aorta abdominal infrarrenal (BAKER et al., 2006). A isquemia da artéria renal por 45 minutos seguida por 24 horas de reperfusão é o modelo mais frequentemente utilizado (SINGH et al., 2012).

Neste modelo experimental de LRA ocorre diminuição no fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular, aumento da apoptose em células renais, e alterações histológicas renais, como edema, perda da borda em escova, vacuolização, necrose tubular e obstrução dos túbulos por cilindros. Além disso, já foi observado que a I/R em ratos leva a um aumento das espécies reativas de oxigênio, infiltração de neutrófilos no rim, aumento da expressão de citocinas inflamatórias, como IL-1, TNF- $\alpha$  e diminuição da expressão de citocinas anti-inflamatórias, como interleucina-10 (IL-10) e interleucina-4 (IL-4), (BETZ et al., 2012; HAGAR; ABD EL TAWAB, 2012; MOORE; BELLOMO; NICHOL, 2012; WANG et al., 2009). Estes parâmetros encontram-se melhorados quando os animais que passaram pela I/R são tratados



com agentes vasodilatadores, anti-inflamatórios ou anti-oxidantes (HAGAR; ABD EL TAWAB, 2012; KONTOGIANNIS; BURNS, 1998; ZOU et al., 2013).

#### 1.1.4. MANEJO CLÍNICO DA LRA

O manejo atual da LRA é não específico e associado a cuidados de suporte limitados, assim estudos de novas abordagens são necessários (FURUICHI et al., 2012). Atualmente a prevenção é a melhor maneira de melhorar os resultados em pacientes críticos com disfunção renal. Entre estas formas de prevenção podemos citar o uso de cristaloides isotônicos para expansão de volume intravascular em pacientes de risco com LRA e o uso de vasopressores em conjunto com fluidos em pacientes com choque vasomotor com risco de LRA. Os diuréticos também são usados como forma de minimizar os efeitos da LRA depois que a doença já está instalada. Eles agem principalmente gerenciando a sobrecarga de volume e otimizando o equilíbrio ácido-base e a homeostase de eletrólitos. (“KDIGO Clinical Practices Guideline for Acute Kidney Injury”, 2012; RICCI; RONCO, 2012).

Alguns vasodilatadores, como dopamina e fenoldopam, já foram utilizados na clínica como forma de tratamento para a LRA, porém, alguns estudos demonstraram a existência de efeitos adversos com a utilização destes medicamentos. O Guia de Práticas Clínicas para Lesão Renal Aguda recomenda o abandono do uso destas drogas vasodilatadoras exclusivamente para tratamento e prevenção da LRA. Os peptídeos natriuréticos também são agentes vasodilatadores e diversos deles são usados na clínica ou estão em desenvolvimento para o tratamento de disfunção renal, possuindo potencial para serem utilizados como tratamento da LRA. No entanto, ainda são necessários mais estudos clínicos para saber se os peptídeos

natriuréticos podem ser efetivamente administrados em pacientes com LRA (“KDIGO Clinical Practices Guideline for Acute Kidney Injury”, 2012).

A dificuldade em encontrar um novo alvo terapêutico reside em diversos fatores, como as múltiplas causas da LRA, conhecimento limitado sobre os processos envolvidos no desenvolvimento da LRA e da falta de marcadores de função renal que podem identificar a LRA em estágios iniciais (MOORE; BELLOMO; NICHOL, 2012). Diversas drogas para tratar a LRA têm sido testadas nos últimos anos, porém nenhuma medicação específica está disponível na prática clínica, sendo necessária a pesquisa de novos fármacos que possam efetivamente tratar a doença (RICCI; RONCO, 2012).

## 1.2. LECTINAS

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que se ligam de forma reversível a carboidratos e a substâncias que contêm açúcar, aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados (FAHEINA-MARTINS et al., 2012; GOLDSTEIN et al., 1980). Devido à sua capacidade de se ligar aos oligossacarídeos das membranas celulares, as lectinas participam de numerosos processos celulares (ASSREUY et al., 2009).

As primeiras lectinas vegetais a serem descritas foram a ricina, isolada da mamona (*Ricinus communis*), e a abrina, isolada do jequiriti (*Abrus precatorius*), em 1888. Estas substâncias eram tóxicas e apresentavam propriedades de hemaglutinação, tendo sido utilizadas como modelos antigênicos para estudos imunológicos que demonstraram a especificidade da resposta de anticorpos (SHARON; LIS, 2004).

Em 1919, a lectina concavalina A (conA) foi isolada da *Canavalia ensiformis* e também apresentava propriedades de hemaglutinação. Duas décadas depois, foi

demonstrada que a hemaglutinação pela conA era inibida pela sacarose, evidenciando pela primeira vez a especificidade das lectinas por açúcares (SHARON; LIS, 2004).

Até a década de 60 já haviam sido isoladas várias proteínas açúcar-específicas que tinham especificidade por determinados grupos sanguíneos, aglutinando apenas hemácias de alguns grupos, mas sem apresentar nenhum efeito em outros. Devido a esta habilidade das proteínas em distinguir entre eritrócitos de diferentes tipos sanguíneos foi proposto o nome lectinas (do latim *legere*, que significa escolher). O ritmo de isolamento destas proteínas aumentou muito após a introdução da cromatografia de afinidade para purificação das lectinas, em 1957 (SHARON; LIS, 2004).

Além das plantas, as lectinas também podem ser encontradas em vários outros organismos, como bactérias, algas, fungos, animais vertebrados e invertebrados, e vírus (FAHEINA-MARTINS et al., 2012; GOLDSTEIN et al., 1980). À medida que os estudos avançaram, foram descobertas que as lectinas possuem funções específicas em cada um destes organismos. Alguns exemplos estas funções podem ser visualizados na Tabela 4.

**Tabela 4:** Funções das lectinas nos organismos. Adaptado de Sharon, 2004.

Lectina		Função
<b>Microorganismos</b>	Ameba	Infecção
	Bactérias	Infecção
	Vírus	Infecção
<b>Plantas</b>	Diversas	Defesa
	Leguminosas	Simbiose com bactérias fixadoras de oxigênio
<b>Animais</b>	Calnexina, Calreticulina	Controle da biossíntese de glicoproteínas
	Colectinas	Imunidade inata
	Dectina	Imunidade inata
	Galectinas	Regulação do crescimento celular e apoptose, regulação do ciclo celular, modulação das interações célula-célula e célula-substrato
	Receptor de manose do macrófago	Imunidade inata, <i>clearance</i> de glicoproteínas sulfatadas
	Receptores man-6-P	Transporte de enzimas lisossomais
	L-selectina	<i>Homing</i> de linfócitos
	E- e P-selectinas	Migração de leucócitos para locais de inflamação
	Siglecs	Interações célula-célula no sistema imune e neural
	Espermadesina	Interações óvulo-espermatozóide

Além de seu papel em cada organismo onde estão presentes e das propriedades de hemaglutinação, novas aplicações começaram a ser descritas para as lectinas,

como atividade imunobiológica, vasomoduladora, antinociceptiva, dentre outras. (ASSREUY et al., 2009; NUNES et al., 2009; SILVA et al., 2011). Portanto, atualmente, o termo “lectina” possui um amplo sentido, sendo utilizado para designar as proteínas que se ligam a carboidratos, não catalisam reações com seus ligantes e não são anticorpos (VIANA et al., 2002).

Apesar de estarem amplamente distribuídas pela natureza e em praticamente em todos os tipos de organismos vivos, as lectinas mais estudadas são as derivadas de plantas, particularmente da família Leguminosae. As lectinas de leguminosas são um grande grupo de proteínas estruturalmente similares, com especificidades distintas aos carboidratos. A subtribo Diocleinae compreende 13 gêneros, e já foram isoladas lectinas de plantas pertencendo a três destes gêneros: *Dioclea*, *Canavalia* e *Cratylia* (SILVA et al., 2011).

Entre estas lectinas da família Leguminosae, podemos destacar a obtida de sementes de *Dioclea violacea* (Dvl). Esta lectina apresenta estrutura tetramérica independente do pH, que inclui um sitio de ligação com metais, interagindo com o cálcio e o manganês (Figura 1) (BEZERRA et al., 2013). Do mesmo modo que outras lectinas da subtribo Diocleinae, a Dvl apresenta especificidade por resíduos D-glicose ou D-manose (MONTEIRO TÍNEL et al., 2014).



**Figura 1:** Estrutura tetramérica da Dvl com a presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ . O ligante X-man foi utilizado como estabilizador de dobras flexíveis no domínio de reconhecimento de carboidratos (BEZERRA et al., 2013).

Em modelos experimentais de inflamação foi observado que a Dvl, quando aplicada por via endovenosa, diminui a migração de neutrófilos na cavidade peritoneal e diminui o edema de pata em ratos com inflamação induzida por carragena. A Dvl possui estrutura similar às selectinas e o possível mecanismo pelo qual a Dvl diminui a inflamação é por competir com as selectinas pelos mesmos sítios de ligação, impedindo o recrutamento de células inflamatórias (ASSREUY et al., 1997). Além da atividade anti-inflamatória, a Dvl possui propriedades vasodilatadoras, induzindo relaxamento de endotélio mediado pelo NO (BEZERRA et al., 2013).

Trabalhos já demonstraram que algumas lectinas extraídas de leguminosas possuem efeitos sobre a fisiologia renal. Lectina obtida de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) foi capaz de aumentar a TFG, o fluxo urinário, a resistência vascular renal (RVR) e a excreção de íons sódio, potássio e cloreto (TEIXEIRA et al., 2001). As lectinas provenientes de *Canavalia ensiformis* (ConA) e *Dioclea guianensis* (DGuil)

também foram capazes de aumentar a TFG e a resistência vascular renal (RVR) (HAVT et al., 2003).

No entanto, os efeitos da Dvl sobre a função renal continuam desconhecidos. Devido às suas propriedades vasodilatadoras e anti-inflamatórias, acredita-se que a Dvl possua efeitos benéficos sobre a LRA. Portanto, neste estudo propõe-se o tratamento com Dvl em ratos com LRA, a fim de verificar se ocorrerá melhora na função renal, e a influência da Dvl em outros parâmetros, como marcadores inflamatórios e estresse oxidativo.

## 2. JUSTIFICATIVA

A lesão renal aguda é caracterizada por um declínio na função renal, sendo uma complicação comum em pacientes críticos em hospitais e estando associada com aumento do tempo de internação e do risco de morte destes pacientes. Esta doença normalmente é decorrente de isquemia renal, devido à presença de outras doenças pré-existentes. Atualmente não existem medicamentos específicos para tratar a LRA, sendo que a lectina de *Dioclea violacea* pode ser uma substância promissora para o tratamento da LRA devido às suas ações anti-inflamatórias e vasodilatadoras.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do tratamento com lectina de *Dioclea violacea* em ratos Wistar com LRA.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar, em ratos submetidos à isquemia/reperfusão renal, a influência da lectina de *Dioclea violacea* sobre os seguintes parâmetros:

- Função e hemodinâmica renal, através da taxa de filtração glomerular, fluxo plasmático renal, fluxo sanguíneo renal, resistência vascular renal, creatinina plasmática, uremia e proteinúria;
- Alterações morfológicas renais, analisado pela deposição de material proteico nos túbulos, dilatação e necrose tubular;
- Infiltração de neutrófilos no rim;
- Apoptose em células renais;
- Estresse oxidativo, avaliado pela produção de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, peroxinitrito, radical hidroxila e óxido nítrico intrarrenais.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. LECTINA

Lectina de sementes de *Dioclea violacea* foram isoladas por cromatografia conforme técnica estabelecida (TEIXEIRA et al., 2006). Primeiramente, as sementes de *Dioclea violacea* foram trituradas em um pó fino e misturadas a 0,15 mol/L de NaCl (1:10 p/v) em temperatura ambiente por 4 horas. O extrato foi centrifugado a 20000 g por 20 minutos a 5°C e o sobrenadante foi aplicado à coluna Sephadex G-50 (Amersham-Biosciences, USA) pré-equilibrada com 0,15 mol/L de NaCl contendo 5 mmol/L de CaCl<sub>2</sub> e 5mmol/L de MnCl<sub>2</sub>. Após remover o material não ligado, a Dvl foi eluída com 0,1 mol/L de glicose na solução equilibrada. Em seguida, a fração foi submetida a 1 hora de diálise com 0,1 mol/L de ácido acético, sucedida por 24 horas de diálise com água destilada. Finalmente, a lectina foi liofilizada e armazenada a 5°C. Para os experimentos, a lectina foi dissolvida em solução salina 0,9%. A lectina utilizada no presente estudo foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Benildo Cavada da Universidade Federal do Ceará.

### 4.2. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste estudo, foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, pesando entre 200g e 300g, provenientes do biotério do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Os animais foram mantidos no biotério em gaiolas individuais, receberam água e ração *ad libitum* e foram mantidos sob ciclo claro/escuro de 12 horas.

A criação e o manuseio de animais foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBIO) e sociedades de biologia e fisiologia experimentais. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES, protocolo #58/2013).

#### 4.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais:

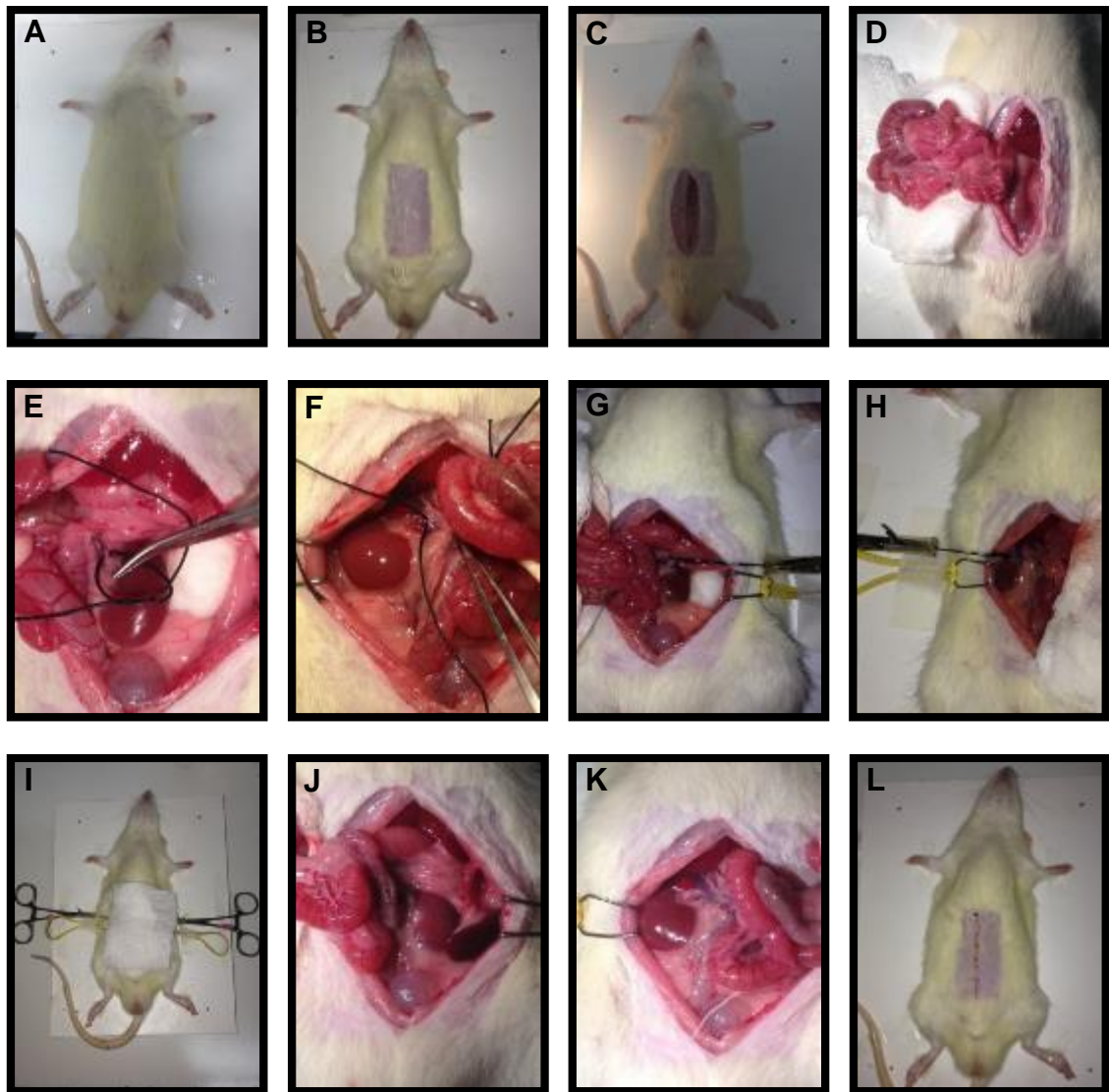
- Sham + veículo: os animais deste grupo foram submetidos à cirurgia fictícia Sham e receberam salina 0,9%.
- Sham + Dvl: os animais deste grupo foram submetidos à cirurgia fictícia Sham e foram tratados com lectina de *Dioclea violacea*.
- I/R + veículo: os animais foram submetidos à isquemia/reperfusão renal e receberam salina 0,9%.
- I/R + Dvl: os animais foram submetidos à isquemia/reperfusão renal e tratados com lectina de *Dioclea violacea*.

#### 4.4. TRATAMENTO

O tratamento com veículo (100 µL de 0,9% NaCl, i.v.) ou Dvl (1 mg/kg, i.v.) foi realizado 30 minutos antes da indução da IRA ou cirurgia Sham, sob anestesia de ketamina (91 mg/kg) e xilazina (9,1 mg/kg), através da veia peniana.

#### 4.5. INDUÇÃO DA LESÃO RENAL AGUDA

Os animais foram anestesiados com ketamina (91 mg/kg) e xilazina (9,1 mg/kg) por via intraperitoneal e posicionados em decúbito dorsal. Após a tricotomia foi realizada uma incisão abdominal e os pedículos renais foram expostos e amarrados com linha cirúrgica (endocort, nº0, Laboratórios Bruneau S.A.), interrompendo suprimento de sangue aos rins. Após 45 minutos de isquemia bilateral a linha foi removida e o fluxo sanguíneo para os rins, reestabelecido (BETZ et al., 2012; SIVARAJAH et al., 2003). Logo depois, foram suturadas a camada muscular (catgut simples 4.0, Shalon) e a incisão cutânea (endocort, nº0, Laboratórios Bruneau S.A.). Os animais do grupo Sham foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, exceto pela ligadura dos pedículos renais. Após a cirurgia, os animais receberam injeção subcutânea de 1 mL de NaCl 0,9% para prevenir desidratação e foram mantidos em observação até se recuperarem da anestesia (BETZ et al., 2012). As análises foram realizadas 24 horas após o reestabelecimento do suprimento sanguíneo renal. As etapas da realização da cirurgia de I/R podem ser visualizadas na Figura 2.



**Figura 2:** Fotos ilustrativas da isquemia/reperfusão renal. A: animal posicionado em decúbito dorsal; B: tricotomia; C: incisão no abdômen; D: exteriorização do intestino para exposição do rim; E: isolamento da artéria renal direita; F: isolamento da artéria renal esquerda; G: isquemia do rim direito (confirmada pela mudança de coloração do tecido renal); H: isquemia do rim esquerdo (confirmada pela mudança de coloração do tecido renal); I: manutenção da isquemia por 45 minutos; J: reperfusão do rim direito (confirmada pela mudança de coloração do tecido renal); K: reperfusão do rim esquerdo (confirmada pela mudança de coloração do tecido renal); L: sutura após a cirurgia.

#### 4.6. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

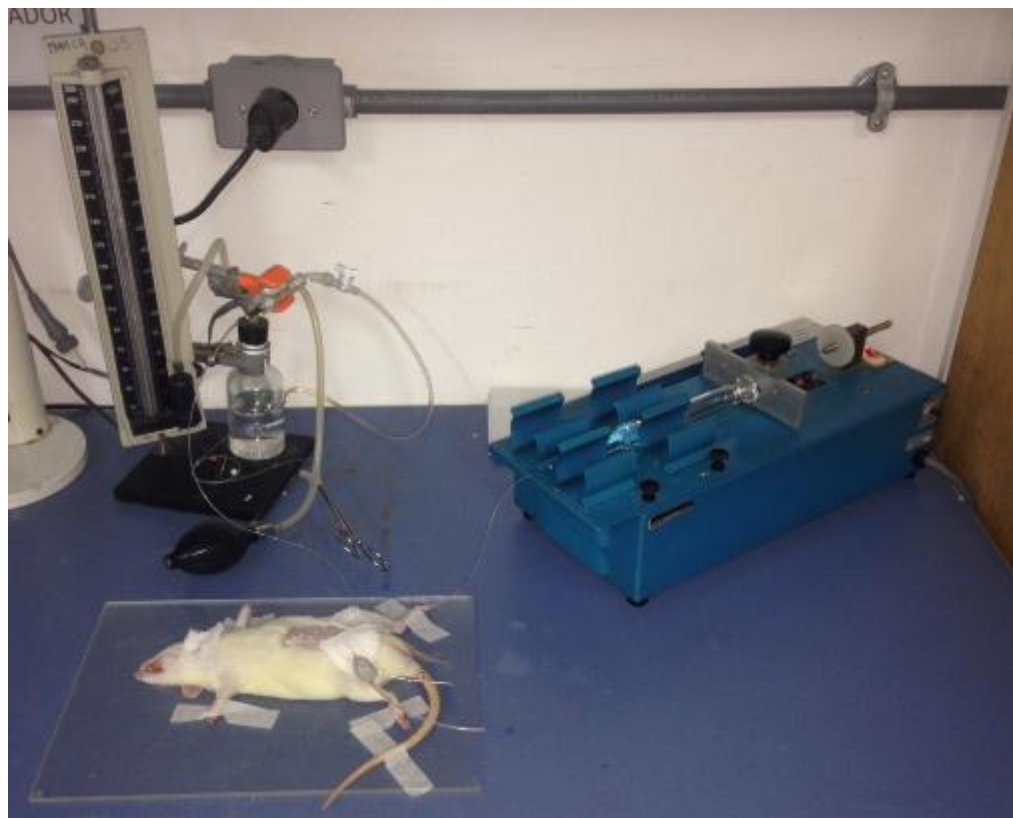
Logo após a cirurgia, os animais foram alocados em gaiolas metabólicas por um período de 24 horas para coleta de urina. A urina produzida durante esse tempo foi mensurada e utilizada para dosagem de proteínas. O plasma coletado após a permanência dos animais nas gaiolas metabólicas foi utilizado para dosagem de ureia e creatinina. A ureia e creatinina foram dosadas usando kits colorimétricos (Bioclin®, Belo Horizonte, Brasil) e a proteinúria determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

#### 4.7. PROTOCOLO DE FUNÇÃO RENAL

Vinte e quatro horas após a reperusão do rim, a função renal foi avaliada usando o *clearance* de inulina e paraaminohippurato (PAH) para estimar a taxa de filtração glomerular (TFG) e o fluxo plasmático renal (FPR), respectivamente. A inulina é um polissacarídeo que não se liga a proteínas plasmáticas, é livremente filtrado pelos rins, não sofre metabolismo, secreção ou absorção tubular. Seu *clearance* é um método muito acurado para a medida da TFG. Já o PAH é um ânion orgânico que é filtrado pelo glomérulo e secretado pelo túbulo proximal, características que o tornam um marcador muito utilizado na determinação do FPR (TOTO, 1995).

Para tanto, os animais foram anestesiados com tiopental (50 mg/Kg) e traqueostomizados por um tubo de polietileno (PE-210) para facilitar a respiração, seguida pela inserção de uma cânula de polietileno (PE-20) na artéria femoral esquerda, para aquisição dos parâmetros hemodinâmicos, e na veia femoral esquerda, por onde foram infundidas as soluções. A bexiga foi exposta e canulada

com um cateter PE-240 para coleta da urina durante o experimento. A cânula introduzida na artéria foi conectada a um transdutor de pressão (Cobe Laboratories, USA), que estava ligado a um sistema de aquisição de dados (MP100, Biopac Systems, USA) para monitoramento contínuo da pressão arterial e da frequência cardíaca. A cânula inserida na veia foi conectada a uma cânula extensora PE-50, que estava unida a uma seringa com capacidade de 20 mL (BD, Yale, Brasil), onde foram adicionadas as soluções de infusão. Para realização das infusões com velocidade constante, a seringa foi posicionada em uma bomba infusora (Harvard Apparatus, USA) (Figura 3).



**Figura 3:** Animal canulado conectado à coluna de mercúrio para aquisição da pressão arterial e à bomba de infusão para infusão constante das soluções.

A primeira infusão, contendo salina 0,9% e manitol 3% foi realizada a uma taxa de 0,06 ml/minuto durante 30 minutos. Por se tratar de um diurético osmótico, o manitol foi utilizado pra aumentar a produção de urina nos animais (KARAJALA; MANSOUR; KELLUM, 2009). Logo depois, foi injetada uma solução *prime* contendo 1 ml de salina 0,9%, inulina (300 mg/kg) e PAH (6,66 mg/kg), com a finalidade de elevar a concentração sanguínea destas substâncias. Em seguida, foi iniciada uma infusão a 0,06 ml/minuto contendo salina 0,9%, inulina 15 mg/ml e PAH (4mg/ml), com a finalidade de manter a concentração destas substancias constante no sangue, que foi mantida durante todo o período do experimento.

Quatro amostras de urina e sangue foram coletadas a cada 30 minutos, começando 30 minutos após a injeção da solução *prime*. O hematócrito foi medido usando tubo capilar heparinizado (Perfecta), após a centrifugação do sangue por 1 minuto a 10000 rpm (Centrimicro Mod 211, Fanem - SP). O restante da amostra de sangue coletado foi centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm (Centrifuge 5415D, Eppendorff, Germany), e o plasma utilizado para a dosagem de inulina e PAH.

As concentrações plasmática e urinária de inulina e PAH foram medidas em espectrofotômetro (Biospectro, SP 220) conforme técnicas estabelecidas (ROCCO et al., 2008). A TFG e o FPR foram calculados a partir do clearance das respectivas substâncias, de acordo com a seguinte fórmula:

$$Cl = \frac{\left( \frac{[X_u] \times FU}{[X_p]} \right)}{m}$$

Onde:

Cl: clearance da substância (inulina ou PAH) em relação ao peso do animal

$X_u$ : concentração da substância na urina



$X_p$ : concentração da substância no plasma

FU: fluxo urinário

m: peso corporal do animal (kg)

O fluxo sanguíneo renal (FSR) e a resistência vascular renal (RVR) foram determinados matematicamente como descritos anteriormente (MAGALHÃES et al., 2006). O FSR foi calculado pela equação:

$$FSR = \frac{FPR}{(1 - HCT)}$$

Onde:

FSR: fluxo sanguíneo renal

FPR: fluxo plasmático renal

HCT: hematócrito

A medida da RVR foi baseada na lei de Ohm. Para isso, foram utilizados os valores do FSR e da pressão arterial média (PAM) obtidos durante o experimento, de acordo com a seguinte equação:

$$RVR = \frac{PAM}{FSR}$$

Onde:

RVR: resistência vascular renal

PAM: pressão arterial média

FSR: fluxo sanguíneo renal

#### 4.8. HISTOLOGIA RENAL

No fim do experimento, os animais foram eutanasiados com sobredose de tiopental sódico (100 mg/Kg) e o rim esquerdo foi coletado e fixado em solução de formaldeído a 10% por imersão. Após a fixação, os rins foram desidratados em concentrações progressivas de álcool, diafanizados em xilol, incluídos em parafina e cortados a 4 µm de espessura. Em seguida, as lâminas foram desparafinizadas com xilol e coradas com hematoxilina-eosina. Os cortes foram avaliados em relação às alterações histopatológicas, como dilatação tubular, necrose tubular e deposição de material proteico (PUNDIR et al., 2013).

#### 4.9. ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE

A infiltração de neutrófilos foi avaliada medindo a atividade de mieloperoxidase (MPO) renal. Neutrófilos de diferentes espécies contêm grandes quantidades de MPO e a dosagem desta enzima possibilita demonstrar o componente inflamatório de forma quantitativa (BRADLEY et al., 1982; HAGAR; ABD EL TAWAB, 2012).

Para isso, foram pesados 100 mg dos rins e homogeneizados em 2000 µl de tampão fosfato de potássio 0,05 M contendo 5 mg/ml de brometo de Hexa-1,6-bis-deciltrimetilamônio (HTAB) e 1,85 mg/ml de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) em pH 6,0. O homogenato foi centrifugado a 12500 g durante 15 minutos a 4°C para obtenção do sobrenadante. 75 µl do sobrenadante foram misturados a 1425 µl de tampão fosfato de potássio contendo 0,167 mg/ml de hidrocloreto de o-dianisidina e 0,05% de peróxido de hidrogênio. A leitura foi feita imediatamente em espectrofotômetro, a 460 nm, e registrada em intervalos de 15 segundos durante 10 minutos.

#### 4.10. ISOLAMENTO DE CÉLULAS RENAIIS

Células renais foram isoladas conforme técnica padronizada (DIAS et al., 2014; FOLKMANN; LOFT; MØLLER, 2007) e utilizadas posteriormente nas análises por citometria de fluxo. Para tanto, os rins foram perfundidos com solução de Krebs-Hepes, coletados, divididos em córtex e medula, triturados com uma tesoura cirúrgica e incubados em solução de extração contendo 25% de Tripsina em EDTA por 30 minutos a 37°C para dissociação das células. Logo depois o extrato de células foi filtrado através de uma membrana de nylon (BD falcon 70 µm) para remover os resíduos celulares e as amostras foram lavadas em tampão fosfato salino (PBS) para remoção das enzimas. As células foram armazenadas a -80°C em solução contendo 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) em soro fetal bovino (SFB) até posterior análise.

#### 4.11. DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

A análise de ROS foi realizada por citometria de fluxo conforme descrito anteriormente (CAMPAGNARO et al., 2013; TONINI et al., 2013). Dihidroetídio (DHE) e diacetato de 2'7'diclorofluoresceína (DCF-DA) foram usados para detectar ânion superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) intracelular, respectivamente. Devido a sua capacidade de penetrar livremente as membranas celulares, o DHE é amplamente utilizado para monitorar a produção de  $\bullet\text{O}_2^-$ . Após reação com  $\bullet\text{O}_2^-$ , o DHE é oxidado formando etídio, um produto fluorescente vermelho que se liga ao DNA e amplifica o sinal de fluorescência. O DCF-DA é um

indicador de produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  não fluorescente, e quando oxidado no interior da célula converte-se à forma fluorescente que permanece presa na célula.

DHE (160  $\mu\text{M}$ ) e DCF-DA (20 mM) foram adicionados à suspensão de células ( $10^6$  células) e incubados a  $37^\circ\text{C}$  por 30 minutos, no escuro, para estimar as concentrações intracelulares de  $\cdot\text{O}_2^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Como controle positivo, as amostras foram tratadas por 5 minutos com 10  $\mu\text{M}$  de doxorrubicina ou 50 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para criar estresse oxidativo sem causar toxicidade às células, e como controle negativo, as células foram incubadas com etanol. As células foram, então, lavadas, ressuspensas em PBS, e os níveis de ROS foram analisados imediatamente por citometria de fluxo (FACSCanto II, Becton Dickinson, San Juan, CA). Os dados foram analisados usando o software FACSDiva (Becton Dickinson) e a sobreposição de histogramas, construída usando o software FSC Express. Para quantificação da fluorescência do DHE e DCF, as amostras foram adquiridas em duplicata e 10000 eventos foram utilizados em cada medição. As células foram excitadas a 488 nm e as fluorescências do DHE e DCF foram detectadas usando, respectivamente filtros de 585/42 e 530/30. Os dados foram expressos como média geométrica da intensidade de fluorescência.

#### 4.12. DETECÇÃO DE ESPÉCIES ALTAMENTE REATIVAS DE OXIGÊNIO

Espécies altamente reativas de oxigênio, como o radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) e ânion peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), foram seletivamente detectadas pela hidroxifenilfluoresceína (HPF) conforme técnica descrita (SETSUKINAI et al., 2003). Primeiramente,  $10^6$  células renais foram incubadas com HPF (10  $\mu\text{M}$ ) a  $37^\circ\text{C}$  por 30 minutos no escuro. Como controle positivo, as amostras foram tratadas com 100  $\mu\text{M}$  de nitroprussiato de sódio e 10  $\mu\text{M}$  de doxorrubicina. As células foram lavadas, ressuspensas em PBS,

e analisadas por citometria de fluxo (FACSCanto II, Becton Dickinson, San Juan, CA). Os dados foram analisados usando o software FACSDiva (Becton Dickinson) e a sobreposição dos histogramas construídos usando o software FCS Express (De Novo). Para quantificação da fluorescência do HPF, amostras foram adquiridas em duplicata e 10000 eventos foram utilizados em cada medida. As células foram excitadas a 488 nm, a fluorescência foi detectada usando um filtro de 530/30 e os dados foram expressos como média geométrica da intensidade de fluorescência.

#### 4.13. DETECÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

Para estimar a quantidade de óxido nítrico (NO) intrarrenal 2  $\mu$ M do marcador fluorescente 4,5-diaminofluoresceína-2/diacetato (DAF-2/DA) foram adicionados à suspensão de células ( $10^6$ ) e incubados a 37°C por 180 minutos no escuro. Como controle positivo, as amostras foram tratadas com 100  $\mu$ M de nitroprussiato de sódio. Em seguida, as células foram lavadas, ressuspendidas em PBS e imediatamente analisadas no citômetro de fluxo (FACSCanto II, Becton Dickinson, San Juan, CA) (SCHACHNIK et al., 2009). Os dados foram analisados usando o software FACSDiva (Becton Dickinson) e a sobreposição de histogramas construída usando o software FCS Express (De Novo). Para quantificação da fluorescência do DAF as amostras foram adquiridas em duplicata e 10000 eventos foram usados em cada medida. As células foram excitadas a 488 nm, a fluorescência detectada usando filtro de 530/30 e os dados expressos como média geométrica da intensidade de fluorescência.

#### 4.14. AVALIAÇÃO DA APOPTOSE

As células apoptóticas foram quantificadas pela dupla marcação com anexina V-FITC e iodeto de propídio (IP) usando kit de detecção de apoptose (Becton Dickinson, San Juan, CA, USA). Para isso, células renais ( $5 \times 10^5$ ) foram lavadas duas vezes com PBS, 2  $\mu$ l de anexina V-FITC e 2  $\mu$ l de IP foram adicionados e vortexados. As células foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente (25°) no escuro. Por fim, as células foram analisadas no citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson). Células marcadas com Anexina V-/IP+ foram reconhecidas como necróticas, marcadas com Anexina V+/IP+ reconhecidas como apoptose tardia, e marcadas com Anexina V+/IP- reconhecidas como apoptose inicial (MONGA et al., 2013).

#### 4.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA

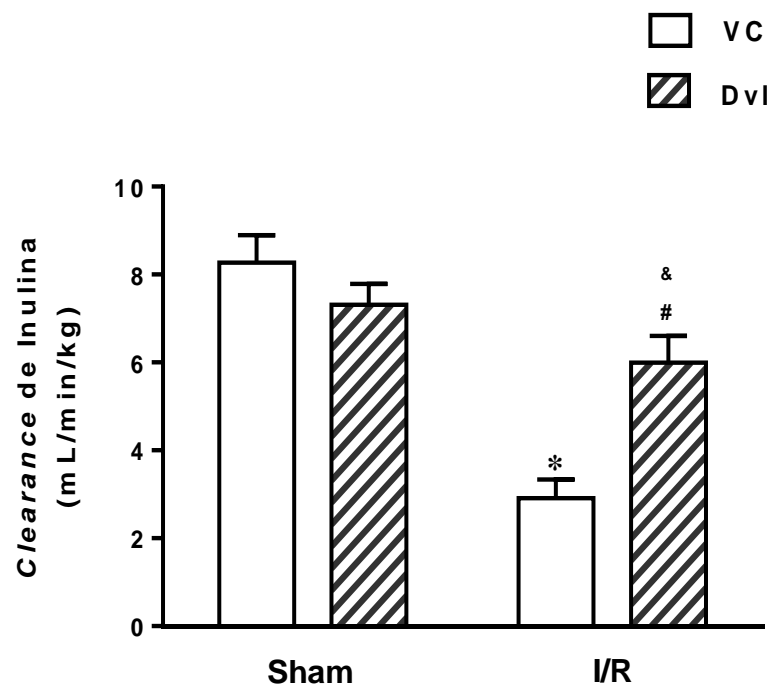
Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. A comparação estatística entre os diferentes grupos foi realizada por análise de variância (ANOVA) de 2-vias, seguida pelo *post hoc* de Tukey. A análise estatística foi feita usando o software Prisma (Prism 6, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significantes.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL

#### 5.1.1. TAXA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR

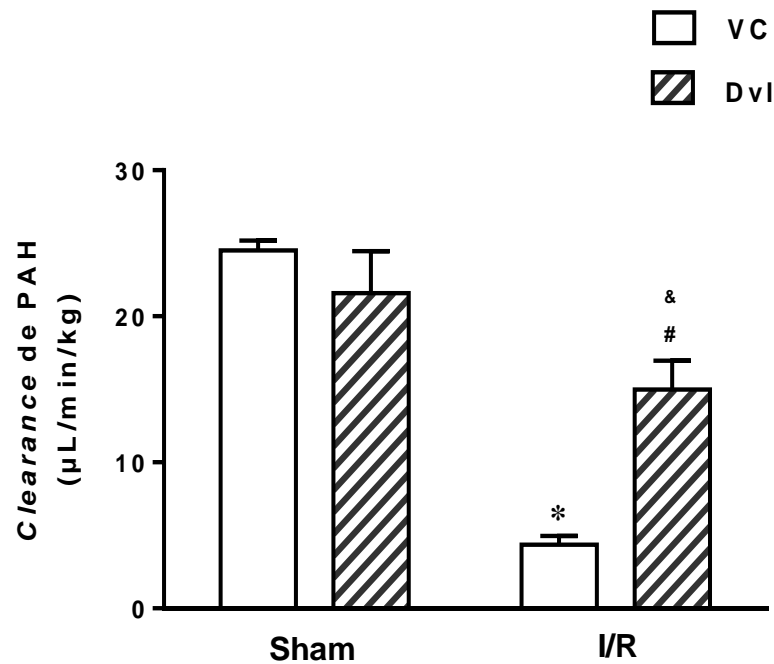
A Figura 4 mostra os resultados do *clearance* de inulina, que representa a TFG. O tratamento com Dvl não alterou o *clearance* de inulina no grupo Sham Dvl ( $7,3 \pm 0,4$  mL/min/Kg), quando comparado com o grupo Sham veículo ( $8,3 \pm 0,6$  mL/min/Kg). Como esperado a I/R resultou em diminuição da TFG ( $2,9 \pm 0,4$  mL/min/Kg), e a administração de Dvl anteriormente à indução da I/R melhorou significativamente este parâmetro ( $6,0 \pm 0,6$  mL/min/Kg).



**Figura 4:** Taxa de filtração glomerular avaliada pelo *clearance* de inulina nos grupos Sham VC (n=6), Sham Dvl (n=6), I/R VC (n=6), I/R Dvl (n=7). \*p<0,05 vs. Sham; &p<0,05 vs. I/R VC; #p<0,05 vs. Sham VC.

### 5.1.2. FLUXO PLASMÁTICO RENAL

Os resultados do *clearance* de PAH, que representa o FPR, são mostrados na Figura 5. O *clearance* de PAH não foi afetado pelo tratamento com Dvl no grupo Sham (VC:  $24,5 \pm 0,7$  vs. Dvl:  $21,6 \pm 2,9$  mL/min/Kg). No entanto, a indução da I/R no grupo I/R veículo reduziu o FPR ( $4,4 \pm 0,6$  mL/min/Kg), que se apresentou melhorado no grupo I/R que recebeu Dvl ( $15,0 \pm 2,0$  mL/min/Kg).

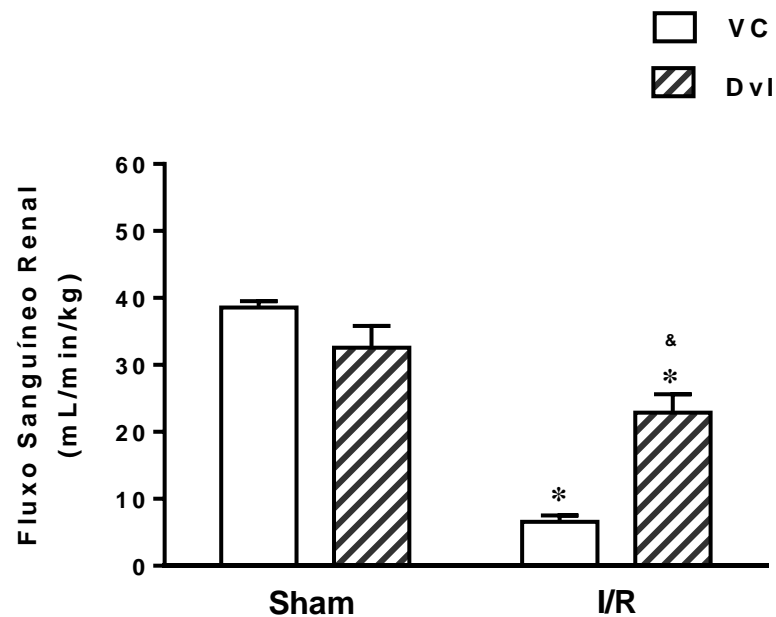


**Figura 5:** Fluxo plasmático renal avaliado pelo *clearance* de PAH nos grupos Sham VC (n=6), Sham Dvl (n=6), I/R VC (n=6), I/R Dvl (n=7). \*p<0,05 vs. Sham; &p<0,05 vs. I/R VC; #p<0,05 vs. Sham VC.



### 5.1.3. FLUXO SANGUÍNEO RENAL

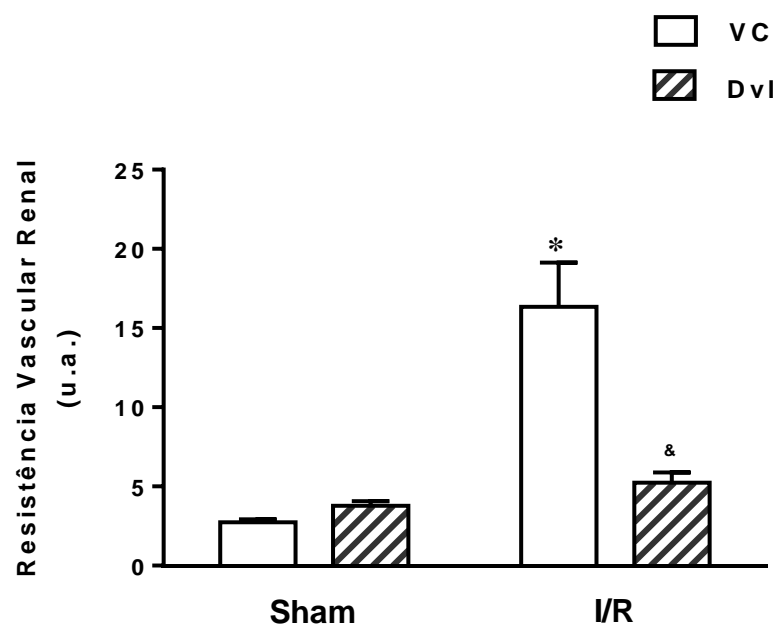
Para o cálculo do fluxo sanguíneo renal foram utilizados os valores de hematócrito medidos durante o protocolo de função renal, que não foi significativamente diferente entre os grupos (Sham VC:  $37 \pm 1$ ; Sham Dvl:  $35 \pm 5$ ; I/R VC:  $32 \pm 8$ ; I/R Dvl:  $35 \pm 5$  %). Portanto, o padrão de resposta do FSR foi semelhante ao do FPR, sem diferenças entre os animais Sham (VC:  $38,6 \pm 0,9$  vs. Dvl:  $32,6 \pm 3,2$  mL/min/Kg) e com uma melhora induzida pela Dvl no FSR do grupo I/R (VC:  $6,6 \pm 0,9$  vs. Dvl:  $22,9 \pm 2,8$  mL/min/Kg). Os resultados do FSR são mostrados na Figura 6.



**Figura 6:** Fluxo sanguíneo renal nos grupos Sham VC (n=6), Sham Dvl (n=6), I/R VC (n=6), I/R Dvl (n=7). \*p<0,05 vs. Sham; &p<0,05 vs. I/R VC.

#### 5.1.4. RESISTÊNCIA VASCULAR RENAL

A RVR encontra-se representada na Figura 7. Observou-se um aumento da RVR no grupo I/R tratado com veículo ( $16,3 \pm 2,8$  a.u.) quando comparada com os grupos Sham VC ( $2,7 \pm 0,2$  a.u.) e Sham Dvl ( $3,8 \pm 0,3$  a.u.). Novamente, o tratamento com Dvl apresentou um efeito positivo sobre a hemodinâmica renal, diminuindo a RVR nos animais I/R Dvl ( $5,2 \pm 0,7$  a.u.).



**Figura 7:** Resistência vascular renal nos grupos Sham VC (n=6), Sham Dvl (n=6), I/R VC (n=6), I/R Dvl (n=7). \*p<0,05 vs. Sham; &p<0,05 vs. I/R VC.

## 5.2. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Não foram observadas diferenças significativas nos valores de proteinúria entre os diferentes grupos. Em relação aos valores de ureia e creatinina plasmáticas, os valores foram similares entre os grupos Sham VC e Sham Dvl. Como esperado, o grupo I/R apresentou uma elevação nestes parâmetros, que foram significativamente reduzidos com o tratamento com a Dvl. Os valores de cada uma destas análises estão representados na Tabela 5.

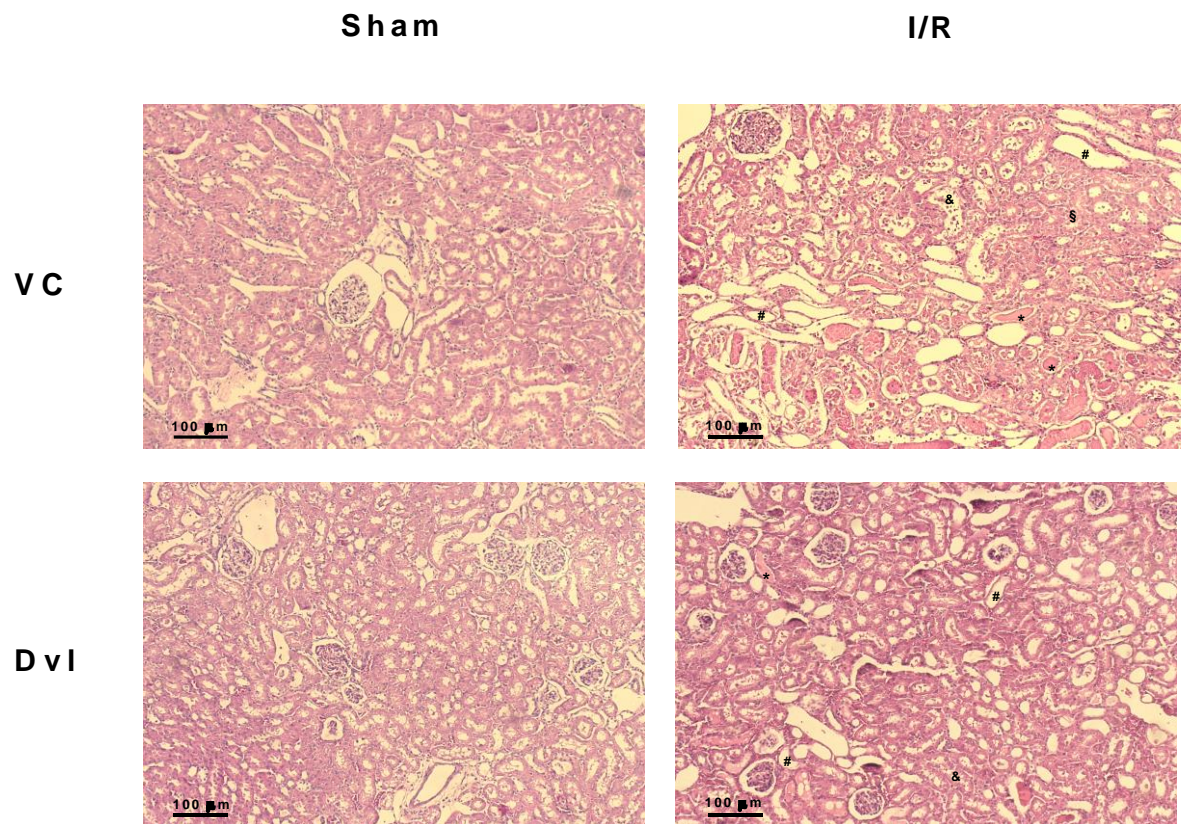
**Tabela 5:** Resultados da proteinúria, uremia e creatinina plasmática nos diferentes grupos.

Parâmetros	Grupos			
	Sham VC (n=5)	Sham Dvl (n=5)	I/R VC (n=5)	I/R Dvl (n=5)
Proteinúria (mg/24 horas)	8,8 ± 1,5	7,2 ± 0,5	11,4 ± 0,9	11,0 ± 1,0
Uremia (mg/dL)	47,9 ± 4,4	41,7 ± 5,2	166,6 ± 35,1*	61,6 ± 13,1 <sup>&amp;</sup>
Creatinina Plasmática (mg/dL)	0,40 ± 0,05	0,50 ± 0,06	1,09 ± 0,23*	0,51 ± 0,05 <sup>&amp;</sup>

\* <0,05 vs. Sham e <sup>&</sup>< 0.05 vs. I/R VC.

### 5.3. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

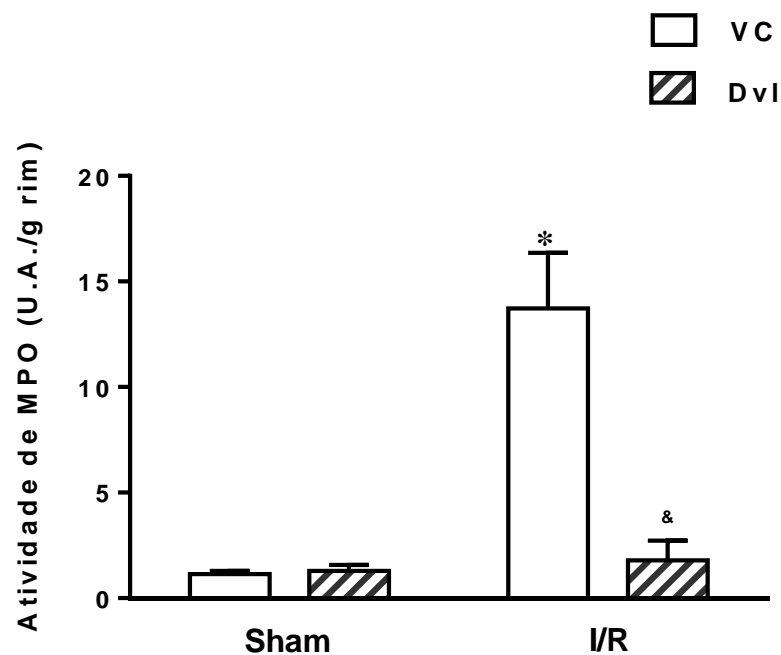
Na análise histológica, não foram observadas alterações morfológicas nos rins dos ratos Sham tratados com veículo e Dvl. No grupo I/R foi observado danos nos túbulos, manifestado como dilatação tubular, necrose tubular e deposição de material proteico e perda da borda em escova. O pré-tratamento com Dvl foi capaz de reduzir a extensão e severidade da lesão. As fotomicrografias representativas da histologia renal podem ser observadas na Figura 8.



**Figura 8:** Fotomicrografias representativas da histologia renal em ratos Sham (esquerda) e em ratos submetidos à isquemia/reperfusão (direita) tratados com veículo (acima) ou Dvl (abaixo). Os grupos Sham VC e Sham Dvl apresentaram morfologia normal. O grupo I/R VC apresentou dano tubular severo, incluindo dilatação tubular (#), deposição de material proteico (\*), necrose tubular (§) e perda da borda em escova (&). O tratamento com Dvl reduziu a extensão do dano tubular. Aumento original x100.

#### 5.4. ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE

A infiltração de neutrófilos foi avaliada pela atividade da MPO, que pode ser observada na Figura 9. A I/R aumentou significativamente a atividade de MPO nos animais tratados com veículo ( $13,7 \pm 2,6$  U.A./g) quando comparados ao Sham veículo ( $1,1 \pm 0,2$  U.A./g) e ao Sham Dvl ( $1,3 \pm 0,3$  U.A./g). O tratamento com Dvl no grupo I/R reduziu o acúmulo de neutrófilos no rim destes animais ( $1,8 \pm 0,9$  U.A./g) quando comparados ao I/R VC.

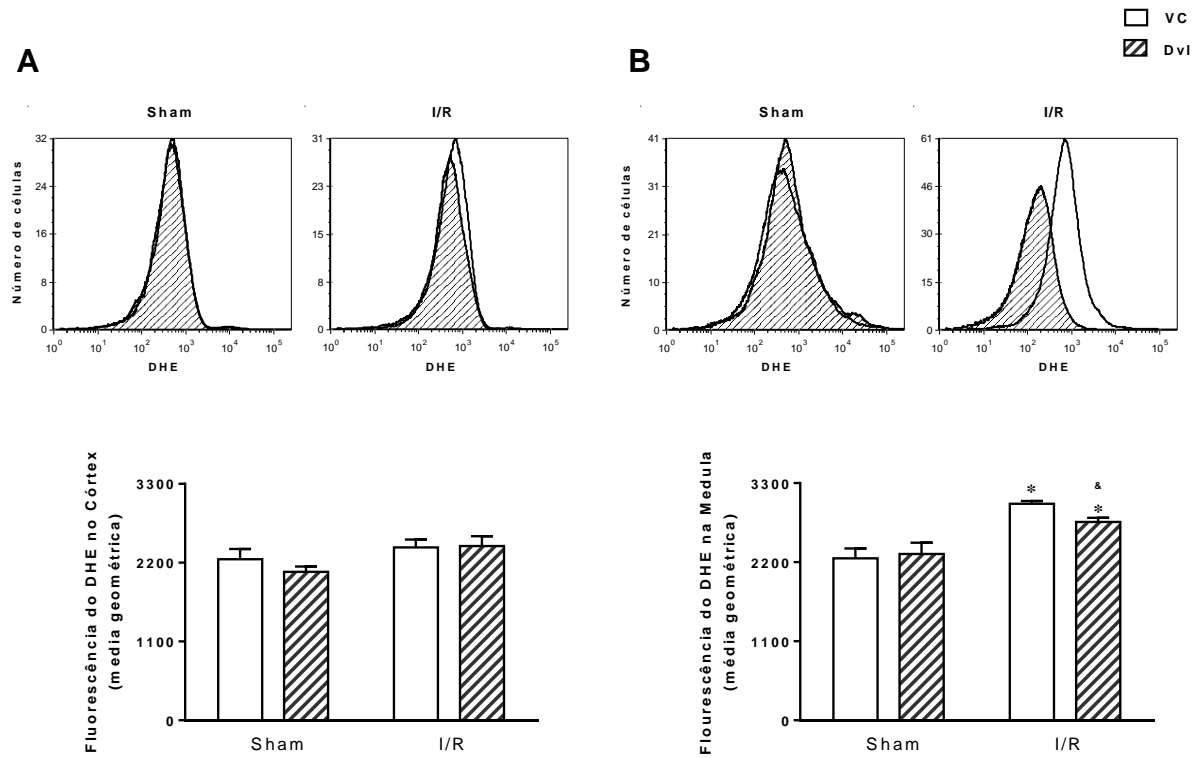


**Figura 9:** Atividade de mieloperoxidase nos grupos Sham VC (n=5), Sham Dvl (n=5), I/R VC (n=5), I/R Dvl (n=5). \*p<0,05 vs. Sham; &p<0,05 vs. I/R VC.

## 5.5. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

### 5.5.1. ÂNION SUPERÓXIDO

A análise do ânion superóxido foi realizada por citometria de fluxo usando o marcador fluorescente DHE. A Figura 10 demonstra os histogramas típicos do DHE na parte superior e a quantificação da produção de ânion superóxido na parte inferior no córtex (A) e medula (B) renal dos animais Sham e I/R. No córtex renal, nenhuma alteração na fluorescência do DHE foi observada (Sham VC:  $2248 \pm 143$ ; Sham Dvl:  $2072 \pm 73$ ; I/R VC:  $2414 \pm 109$ ; I/R Dvl:  $2433 \pm 135$  u.a.). Na medula renal os animais I/R tratados com veículo apresentaram um aumento na produção do ânion superóxido ( $3012 \pm 40$  u.a.) quando comparado com os grupos Sham (VC:  $2254 \pm 137$ ; Dvl:  $2314 \pm 157$  u.a.). Porém, o aumento na fluorescência do DHE foi parcialmente atenuado no grupo I/R Dvl ( $2759 \pm 58$  u.a.).

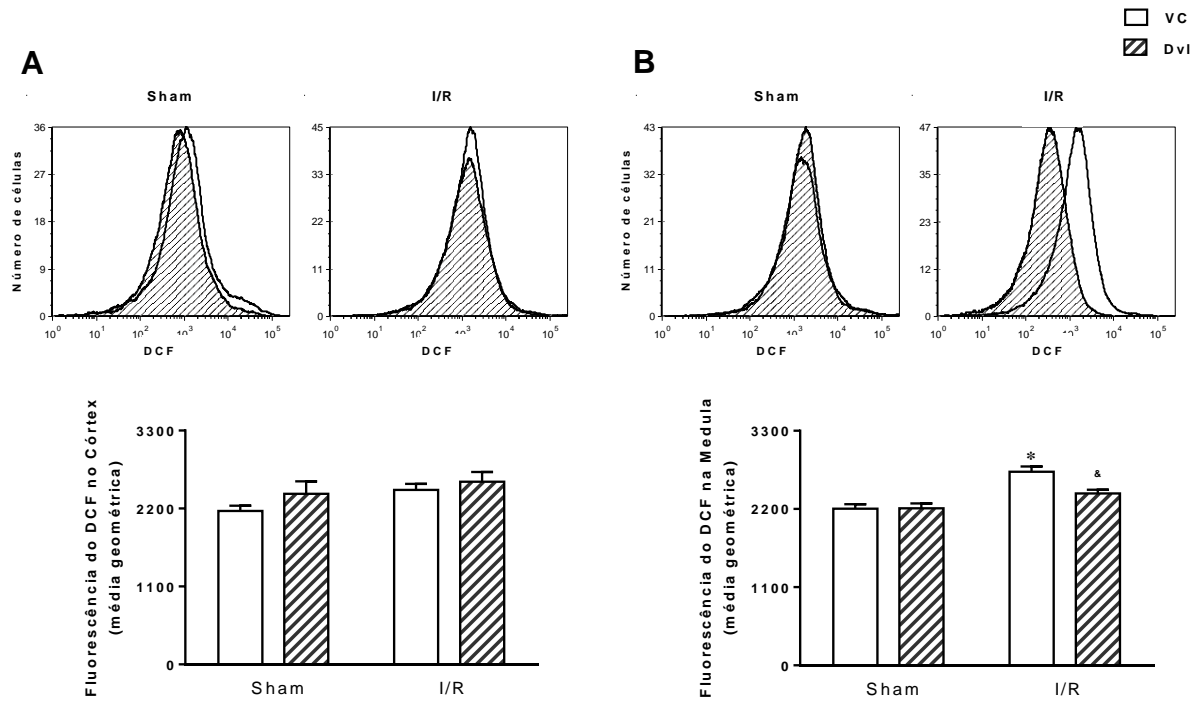


**Figura 10:** Produção de ânion superóxido. Histogramas representativos da análise por citometria de fluxo (painel superior) usando DHE e quantificação da produção de ânion superóxido (painel inferior) nos grupos Sham VC (n=6), Sham Dvl (n=5), I/R VC (n=5) e I/R Dvl (n=6) no córtex (A) e medula (B) renal. \*p<0,05 vs. Sham; &p<0,05 vs. I/R VC.



### 5.5.2. PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

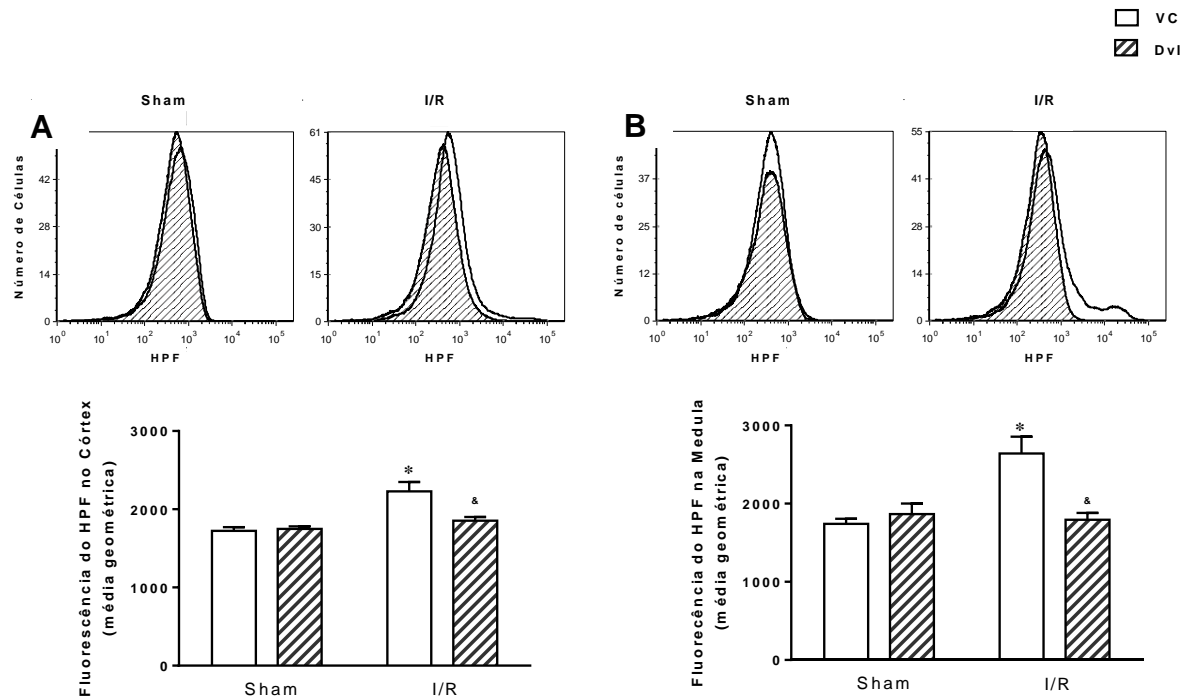
A quantificação do peróxido de hidrogênio foi feita por citometria de fluxo usando o DCF (Figura 11). Histogramas típicos estão demonstrados na parte superior da figura e a quantificação da fluorescência do DCF no córtex (A) e na medula (B) renal, na parte inferior. No córtex renal, a I/R (Sham VC:  $2164 \pm 75$ ; I/R VC:  $2463 \pm 85$  u.a.) e o tratamento com Dvl (Sham Dvl:  $2407 \pm 175$ ; I/R Dvl:  $2576 \pm 138$  u.a.) não afetaram a produção de peróxido de hidrogênio. Novamente, na medula renal, a I/R resultou em aumento da fluorescência do DCF (Sham VC:  $2205 \pm 63$  vs. I/R VC:  $2723 \pm 73$  u.a.). A administração de Dvl por via intravenosa não modificou a produção de peróxido de hidrogênio nos animais Sham ( $2210 \pm 67$  u.a.), mas preveniu o aumento da fluorescência do DCF no grupo I/R ( $2417 \pm 53$  u.a.).



**Figura 11:** Produção de peróxido de hidrogênio. Histogramas representativos da análise por citometria de fluxo (painel superior) usando DCF e quantificação da produção de peróxido de hidrogênio (painel inferior) nos grupos Sham VC (n=6), Sham Dvl (n=5), I/R VC (n=5) e I/R Dvl (n=6) no córtex (A) e medula (B) renal. \*p<0,05 vs. Sham; &p<0,05 vs. I/R VC.

### 5.5.3. RADICAL HIDROXILA E ÂNION PEROXINITRITO

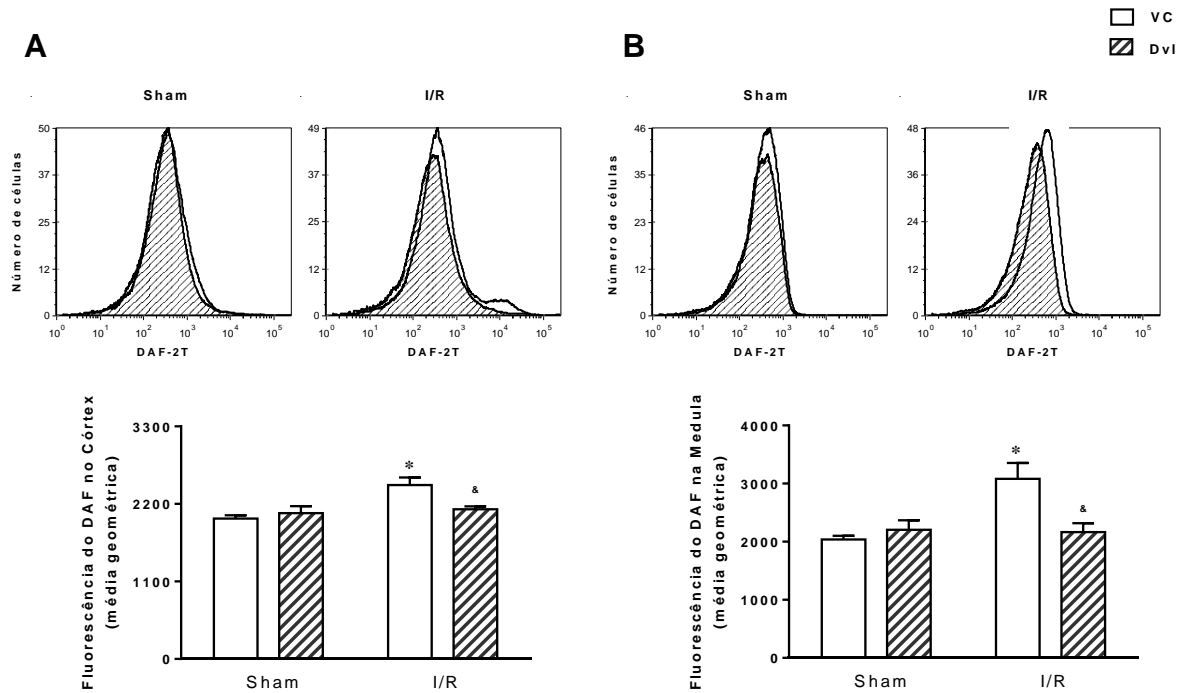
A produção de peroxinitrito e hidroxila foi calculada usando a fluorescência do HPF no córtex e medula renal (Figura 12). Os histogramas (parte superior) e a quantificação do HPF (parte inferior) demonstram que o tratamento com Dvl não exerce nenhum efeito sobre a produção de peroxinitrito e hidroxila no córtex renal (VC:  $1722 \pm 48$  vs. Dvl:  $1749 \pm 31$  u.a.) ou medula (VC:  $1740 \pm 65$  vs. Dvl:  $1866 \pm 134$  u.a.) nos animais Sham. Porém, a I/R aumentou a fluorescência do HPF cortical ( $2228 \pm 121$  u.a.) e medular ( $2641 \pm 215$  u.a.), e o tratamento com Dvl nestes animais resultou na redução da produção de peroxinitrito e hidroxila no rim (córtex:  $1854 \pm 47$ ; medula:  $1792 \pm 88$  u.a.).



**Figura 12:** Produção de radical hidroxila e peroxinitrito. Histogramas representativos da análise por citometria de fluxo (painel superior) usando HPF e quantificação da produção de radical hidroxila e peroxinitrito (painel inferior) nos grupos Sham VC (n=6), Sham Dvl (n=5), I/R VC (n=5) e I/R Dvl (n=6) no córtex (A) e medula (B) renal. \*p<0,05 vs. Sham; &p<0,05 vs. I/R VC.

#### 5.5.4. ÓXIDO NÍTRICO

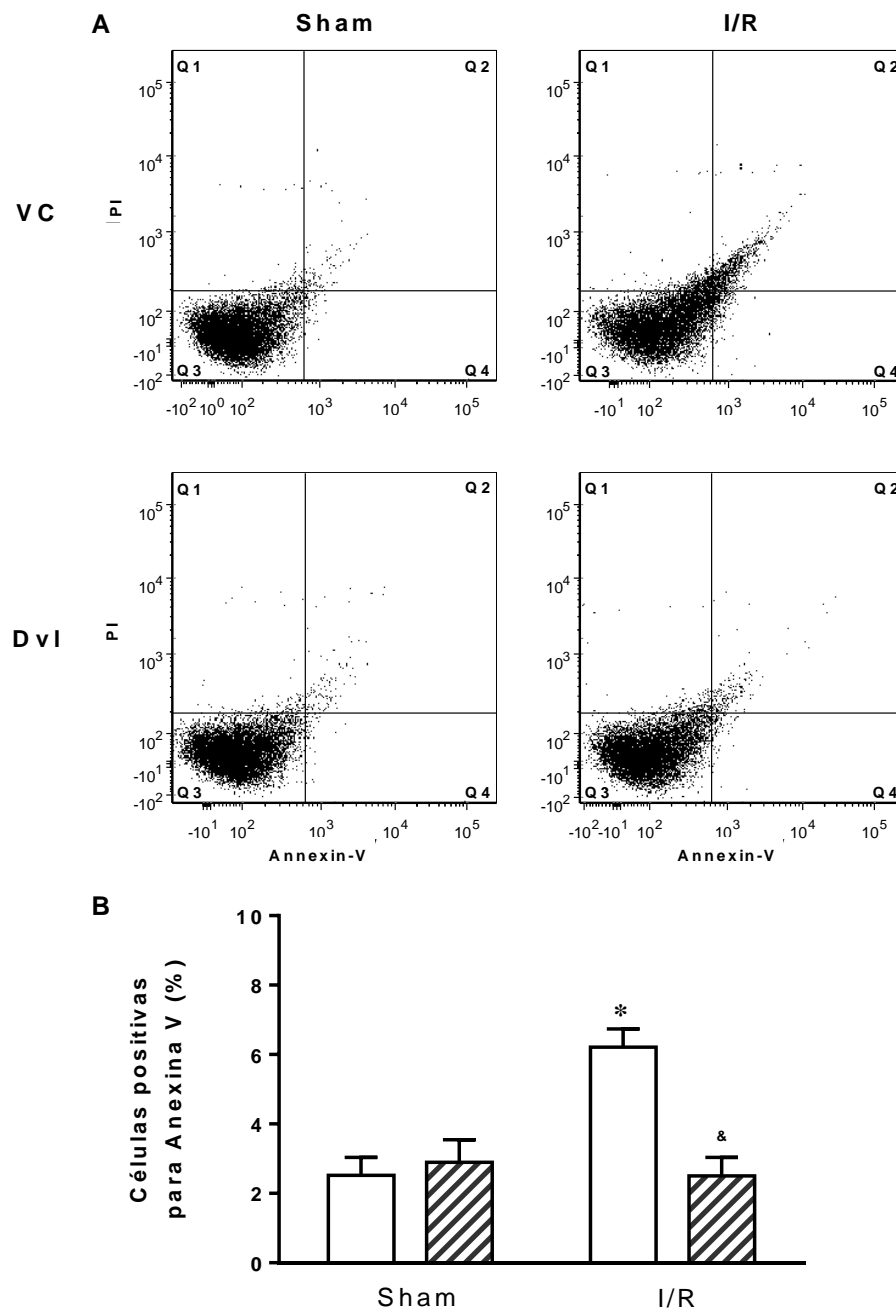
Na Figura 13 observa-se os histogramas típicos do DAF (parte superior) e a quantificação da produção de NO (parte inferior) no córtex e medula renal. O tratamento com Dvl não alterou a fluorescência do DAF nos animais Sham no córtex (VC:  $1992 \pm 47$  vs. Dvl:  $2069 \pm 98$  u.a.) e medula (VC:  $2038 \pm 61$  u.a. vs. Dvl:  $2205 \pm 162$  u.a.) renal. No entanto, o grupo I/R que recebeu veículo apresentou maior produção de NO (córtex:  $2466 \pm 107$ ; medula:  $3081 \pm 274$  u.a.), e o tratamento com Dvl antes da I/R resultou em níveis similares de fluorescência do DAF (córtex:  $2123 \pm 43$ ; medula:  $2164 \pm 154$  u.a.) no grupo I/R Dvl quando comparado ao grupo Sham.



**Figura 13:** Produção de óxido nítrico. Histogramas representativos da análise por citometria de fluxo (painel superior) usando DAF e quantificação da produção de óxido nítrico (painel inferior) nos grupos Sham VC (n=6), Sham Dvl (n=5), I/R VC (n=5) e I/R Dvl (n=6) no córtex (A) e medula (B) renal. \*p<0,05 vs. Sham; &p<0,05 vs. I/R VC.

## 5.6. APOPTOSE

O resultado de apoptose no rim pode ser visualizado na Figura 14, que mostra a marcação pela Anexina V e PI. No início da apoptose, a fosfatidilserina, uma proteína normalmente localizada na superfície interna da membrana plasmática, transloca-se para a superfície externa, ficando disponível para ligação com a Anexina V. O PI é um marcador específico de ácidos nucleicos que penetra nas células caso a membrana esteja permeável, não marcando as células vivas. Deste modo, a citometria de fluxo usando Anexina V e PI pode distinguir células vivas e saudáveis (Q3: Anexina V<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>) de células em apoptose inicial (Q4: Anexina V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) e células em apoptose tardia ou necróticas (Q2: Anexina V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>). Os gráficos representativos (A) e a quantificação de apoptose (B) demonstram que a I/R aumenta significativamente a porcentagem de células apoptóticas ( $6,2 \pm 0,5 \%$ ) quando comparado aos animais Sham (VC:  $2,5 \pm 0,5$ ; Dvl:  $2,9 \pm 0,6 \%$ ). A administração de Dvl exerce um efeito benéfico no grupo I/R Dvl ( $2,5 \pm 0,5\%$ ), resultando em valores de apoptose similares aos observados no grupo Sham.



**Figura 14:** Detecção de apoptose por citometria de fluxo com Anexina-V e IP nos grupos Sham VC (n=4), Sham Dvl (n=5), I/R VC (n=5), I/R Dvl (n=6). (A) Dot plot representativo da citometria de fluxo de células renais marcadas com Anexina-V e PI. (B) Gráfico de barras mostrando a média de porcentagem de células apoptóticas (Q2+Q4) nos diferentes grupos. \*p<0,05 vs. Sham; &p<0,05 vs. I/R VC.



## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da administração da lectina de *Dioclea violacea* anteriormente à indução da lesão renal aguda. Nossos dados demonstraram que a administração de Dvl nos animais com LRA aumentou a taxa de filtração glomerular, o fluxo plasmático renal, o fluxo sanguíneo renal enquanto que, ao mesmo tempo, diminuiu a resistência vascular renal. A Dvl também diminuiu a hiperúremia, creatinina plasmática, apoptose e atividade de mieloperoxidase induzidas pela I/R, e preservou a morfologia do tecido renal. Além disso, análises do estresse oxidativo revelaram que a geração de espécies reativas de oxigênio também foi reduzida pela administração de Dvl no grupo I/R. Em conjunto, todos esses dados indicam que a Dvl pode exercer um efeito potente na melhora da disfunção renal na LRA. Esses resultados benéficos podem estar associados com a redução do estresse oxidativo e redução da inflamação, como observado nos animais experimentais.

A lesão por isquemia reperfusão em rins naturais e transplantados é a principal causa de LRA e um importante determinante da disfunção renal em longo prazo (KENNEDY; ERLICH, 2008). O processo fisiopatológico da LRA seguida de I/R leva a alterações funcionais e estruturais que estão concentradas próximas às células do túbulo proximal e do endotélio (SEMEDO et al., 2009). Diversos eventos patológicos estão envolvidos, como ruptura do citoesqueleto de actina, geração de moléculas reativas de oxigênio, resposta inflamatória e apoptose (BAGUL; FROST; DRAGE, 2013).

O modelo experimental usado para simular a LRA foi a isquemia/reperfusão renal, que foi realizada pela ligadura das artérias renais direita e esquerda durante 45 minutos, seguida de reperfusão por um período de 24 horas. Nós observamos que a

creatinina plasmática aumentou 2,7 vezes nos animais que passaram pela isquemia em relação ao grupo Sham. Além disso, outros estudos estão em conformidade com nossos resultados, demonstrando que este modelo exhibe uma diminuição no fluxo sanguíneo renal e taxa de filtração glomerular, aumento da apoptose e espécies reativas de oxigênio, infiltração de neutrófilos no rim, e a presença de alterações histológicas características da IRA (BETZ et al., 2012; FERREYRA et al., 2013; HAGAR; ABD EL TAWAB, 2012).

Em relação à função renal, nosso trabalho mostrou que o tratamento com a Dvl não interferiu no grupo Sham, porém melhorou a taxa de filtração glomerular, a resistência vascular renal e o fluxo sanguíneo renal dos animais isquêmicos para os níveis normais. Já foi relatado que outras lectinas da subtribo Diocleinae, dos gêneros *Canavalia* e *Dioclea*, foram capazes de promover alterações na função renal. As lectinas da subtribo Diocleinae possuem alta homologia na sequência de aminoácidos, porém podem apresentar diferenças na atividade biológica (ALENCAR et al., 2013; ASSREUY et al., 1997).

Lectinas isoladas de *Canavalia brasiliensis* foram administradas em rim isolado mantido em solução nutritiva, levando ao aumento da taxa de filtração glomerular e do fluxo urinário após 90 minutos do tratamento e ao aumento da pressão de perfusão e da resistência vascular renal após 120 minutos (TEIXEIRA et al., 2001). Em outro trabalho, as lectinas de *Dioclea guianensis* e *Canavalia ensiformis* também foram aplicadas em rins isolados. Ambas provocaram um aumento na pressão de perfusão e na resistência vascular renal, porém não alteraram a taxa de filtração glomerular e o fluxo urinário (HAVT et al., 2003).

Corroborando com esta melhora da função renal no grupo com LRA, a Dvl também foi capaz de reduzir os níveis de uréia e creatinina plasmática, e o dano histomorfológico nos animais I/R, sem interferir no grupo Sham. A melhora na

histologia renal se apresentou por diminuição de deposição de material protéico, diminuição da perda da borda em escova e menor quantidade de túbulos apresentando necrose ou dilatação no grupo I/R pré-tratado com a Dvl quando comparados ao grupo I/R que recebeu veículo.

Um estudo anterior demonstrou que a *Canavalia brasiliensis* possui efeito contrário na histologia renal, provocando aumento da deposição de material protéico no espaço de Bowman (TEIXEIRA et al., 2001). Em relação à proteinúria, esperávamos que estivesse aumentada nos animais com LRA, conforme é comumente observado no modelo experimental de isquemia/reperfusão renal (FERREYRA et al., 2013), porém, nem a I/R e nem o tratamento com Dvl influenciaram este parâmetro. Este fato pode ter ocorrido pois a aplicação da injeção na veia peniana levou à produção de sêmen por alguns animais. As proteínas contidas no sêmen podem ter sido eliminadas durante a coleta de urina na gaiola metabólica, influenciando o resultado final da proteinúria.

Na lesão renal por isquemia/reperfusão, o dano celular é mediado pela inflamação (FEITOZA et al., 2008; HAGAR; ABD EL TAWAB, 2012; SI et al., 2014), e em nosso modelo de I/R nós observamos um aumento na inflamação renal, avaliado pela atividade de MPO. MPO é uma enzima abundante em neutrófilos, e está bem estabelecido que a atividade de MPO reflete a quantidade de neutrófilos que migra para o tecido durante a inflamação (BRADLEY et al., 1982; HAGAR; ABD EL TAWAB, 2012). Além disso, já foi demonstrado que a presença da enzima MPO está diretamente envolvida na lesão renal causada pela I/R (MATTHIJSEN et al., 2007). Nosso estudo mostrou que a atividade de MPO renal se apresentava significativamente aumentada após a I/R, mas foi reduzida pela administração prévia de Dvl. Estes resultados sugerem que a ação renoprotetora da Dvl envolve a inibição da infiltração de neutrófilos.

Do mesmo modo, outros estudos já mostraram que a Dvl é capaz de reduzir a migração de neutrófilos. Em camundongos, o tratamento intravenoso com a Dvl 30 minutos antes da indução de cistite hemorrágica por ciclofosfamida levou a uma redução significativa da infiltração de leucócitos na bexiga (ASSREUY et al. 1999). A Dvl também inibiu a migração de neutrófilos induzida pela carragenina e pela *N*-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina (fMLP) na cavidade peritoneal quando aplicada intravenosamente 30 minutos antes da administração dos agentes irritantes (ASSREUY et al. 1997). Outras lectinas da subtribo Diocleinae, como *Canavalia grandiflora*, *Dioclea guianensis*, *Dioclea virgata* e *Cratylia floribunda*, também apresentaram resultados semelhantes inibindo a infiltração de neutrófilos em modelos de inflamação (ASSREUY et al., 1997; NUNES et al., 2009).

O mecanismo de ação sugerido é que as lectinas atuam impedindo a atividade adesiva das selectinas, competindo pela ligação com os carboidratos na membrana celular de leucócitos ou na membrana endotelial (ASSREUY et al., 1997). Está bem estabelecido que as selectinas desempenham um papel importante na infiltração de neutrófilos no rim na isquemia/reperfusão (HERTER et al., 2013; SINGBARTL; LEY, 2000), e como não testamos a influência da Dvl sobre as selectinas, especulamos que o mecanismo seja o mesmo.

Alem do efeito anti-inflamatório, outros estudos mostraram que a Dvl também exerce ação pró-inflamatória, dependendo da via de administração. Camundongos que tiveram Dvl aplicada na pata por via subcutânea apresentaram aumento da expressão do receptor da citocina pró-inflamatória IL-2 nos linfonodos (BARBOSA et al., 2001). Em ratos, a Dvl administrada na pata por via subcutânea também levou ao aumento da inflamação, provocando edema de pata e aumento da atividade de mieloperoxidase (ALENCAR et al. 2013).

Os motivos pelos quais a Dvl possui ações antagônicas dependendo da via de administração ainda não estão completamente esclarecidos. Sabe-se que as discrepâncias na atividade biológica produzidas pelas lectinas Diocleinae são devido a diferenças nos sítios que se ligam especificamente aos carboidratos. Além disso, foi proposto que a habilidade das lectinas em produzir respostas biológicas distintas está relacionada com as suas afinidades aos receptores das células (CAVADA et al., 2001), indicando que este mecanismo poderia estar envolvido nas diferentes respostas ocasionadas pelas lectinas.

Diversos estudos mostraram que a infiltração de neutrófilos no rim pós-isquêmico é uma das causas da insuficiência renal. Os neutrófilos liberam vários mediadores, incluindo proteases, citocinas e espécies reativas de oxigênio (CHATTERJEE et al., 2000; HAGAR; ABD EL TAWAB, 2012; SINGBARTL; FORLOW; LEY, 2001). Apesar dos neutrófilos serem considerados uma importante fonte de espécies de oxigênio, a reoxigenação após hipóxia é suficiente para causar lesão em vários tipos de células, mesmo na ausência de neutrófilos ativados (LI; JACKSON, 2002).

Em nosso estudo, a produção de espécies reativas e altamente reativas de oxigênio foi avaliada separadamente no córtex e na medula renal através da produção de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, peroxinitrito e hidroxila. Estas espécies reativas de oxigênio são produzidas por vias normais do metabolismo e são retiradas do organismo por antioxidantes, no entanto, em excesso, podem exercer reações prejudiciais (BARADARAN; NASRI; RAFIEIAN-KOPAEI, 2014).

O ânion superóxido é formado quando o oxigênio aceita um elétron ( $O_2 + e^- = \bullet O_2^-$ ) e participa de processos químicos importantes no contexto biológico, como atuar no combate de corpos estranhos durante infecções e como sinalizador molecular (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Na IRA, o  $\bullet O_2^-$  também desempenha um importante papel, atuando no recrutamento de neutrófilos para área da lesão, o que

amplia a extensão do dano inicial (ANDREOLI, 1991; SEHAJPAL et al., 2014). Além disso, apesar do  $\bullet\text{O}_2^-$  ser um oxidante fraco, ele atua como um precursor de espécies de oxigênio mais fortes, como peróxido, peroxinitrito, hipoclorito e cloraminas (ANDREOLI, 1991; MASZTALERZ et al., 2006).

O peróxido de hidrogênio é formado quando o oxigênio recebe dois elétrons ( $\text{O}_2 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ = \text{H}_2\text{O}_2$ ) ou por dismutação de dois ânions superóxidos ( $\bullet\text{O}_2^- + \bullet\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ = \text{H}_2\text{O}_2$ ). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  possui meia-vida maior do que o superóxido e exerce papel importante por ser livremente difundido através das membranas celulares (ANDREOLI, 1991). Esta molécula pode induzir danos por si só, oxidando proteínas que apresentem resíduos de metionina ou grupos tiol muito reativos, como a glutathione (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Assim como ocorre com o  $\bullet\text{O}_2^-$  em modelos experimentais de isquemia/reperfusão renal, é demonstrado que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  apresenta-se aumentado nos rins dos animais insuficientes quando comparado com o Sham (HUANG et al., 2012). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é, ainda, precursor de outras espécies de oxigênio, como ácido hipocloroso e o radical hidroxila (ANDREOLI, 1991).

O radical hidroxila é um oxidante extremamente forte, que está aumentado nos rins quando há lesão renal, como no modelo de insuficiência renal aguda induzido por contraste e antibióticos (ANDREOLI, 1991; HSU et al., 2011). O  $\text{HO}\bullet$  danifica proteínas, membranas celulares do núcleo e mitocondrial, RNA e DNA, podendo levar à ruptura da cadeia de DNA (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O ânion peroxinitrito é um potente oxidante produzido pela reação entre o  $\bullet\text{O}_2^-$  e o NO ( $\text{NO} + \bullet\text{O}_2^- = \text{ONOO}^-$ ). Quando o  $\text{ONOO}^-$  está na forma protonada ( $\text{ONOOH}$ ), possui reatividade semelhante ao  $\text{HO}\bullet$  (LI; JACKSON, 2002; NOIRI et al., 2001). Tanto o  $\text{HO}\bullet$ , quanto o  $\text{ONOO}^-$  podem ser classificados como espécies altamente reativas de oxigênio por possuir poder oxidante forte o suficiente para hidroxilar diretamente anéis aromáticos (SETSUKINAI et al., 2003).

Portanto, na isquemia/reperfusão renal, todas estas moléculas oxidantes reagem, em maior ou menor grau, com proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e lipídios das membranas celulares, resultando em formação de radicais orgânicos, inativação de enzimas, peroxidação lipídica, oxidação proteica e destruição de células renais (MASZTALERZ et al., 2006).

Em nosso trabalho nós observamos um aumento da produção de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e ânion peroxinitrito na medula renal dos animais isquêmicos, e apenas de espécies altamente reativas de oxigênio no córtex renal do grupo I/R, que foram revertidos pelo tratamento com Dvl. Interessantemente, não foram constatadas diferenças na produção de ROS no córtex renal entre os diferentes grupos. O fato da produção de radicais livres ser maior na medula do que no córtex renal pode ser explicada pois o processo fisiopatológico da LRA provocada por isquemia/reperfusão renal desencadeia, principalmente, mudanças estruturais e funcionais em células tubulares e endoteliais, com dano proeminente nos néfrons justamedulares e remodelamento túbulo-intersticial mais evidente na medula do que no córtex (BAGUL; FROST; DRAGE, 2013; VELROYEN et al., 2014). Além disso, estruturas localizadas na medula renal, como o ramo medular ascendente espesso da alça de Henle, são particularmente sensíveis à diminuição do oxigênio, sendo bastante afetadas durante a isquemia (BEŁTOWSKI, 2010).

Tendo em vista que o desenvolvimento do estresse oxidativo contribui para a indução da lesão renal na isquemia/reperfusão, o tratamento da LRA com diversas substâncias antioxidantes tem se mostrado promissor. Como exemplos podemos citar o tempol (CHATTERJEE et al., 2000), a vitamina C (MILORADOVIĆ et al., 2009), agonistas do receptor de proliferação de peroxissomo ativado (BETZ et al., 2012; ZOU et al., 2013), inibidores da fosfodiesterase-4 (MAMMADOV et al., 2012) e

inibidores da fosfodiesterase-5 (ZAHARAN et al., 2015). Moléculas que atuam inibindo a infiltração de neutrófilos também se mostraram capazes de reduzir o estresse oxidativo na LRA (HAGAR; ABD EL TAWAB, 2012).

Em relação à Dvl, nosso trabalho mostrou pela primeira vez seu efeito antioxidante. No entanto, avaliamos apenas o produto final do estresse oxidativo e não investigamos as vias que levam à produção das espécies reativas e altamente reativas de oxigênio. É possível que a Dvl atue diretamente no sistema de defesa antioxidante, aumentando a atividade de enzimas como glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase, que reduzem as taxas de oxidação no organismo e, por conseguinte, interrompem a progressão da lesão na LRA (ABRAHAM; RABI, 2011; MAMMADOV et al., 2012; ZOU et al., 2013). Também é conhecido que a isquemia/reperfusão renal leva ao aumento da atividade de enzimas oxidantes, como NADPH oxidase e xantina oxidase, que geram espécies reativas de oxigênio e induzem metaloproteinases da matriz (TSUDA et al., 2012; WU et al., 2009). A Dvl pode estar afetando estas vias, porém mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

A Dvl também pode interferir na produção do óxido nítrico (NO), um potente antioxidante que pode proteger do dano provocado pelas espécies reativas e altamente reativas de oxigênio (MANGGE et al., 2014). O NO gerado pela enzima eNOS é benéfico, e os mecanismos que aumentam a atividade de eNOS são capazes de proteger contra a lesão renal devido à isquemia/reperfusão (CHIAZZA et al., 2015). No entanto, em nosso modelo de isquemia/reperfusão renal, o NO se encontrou elevado na medula renal do grupo isquêmico, possivelmente pelo aumento da expressão da iNOS, do mesmo modo já observado em outros estudos (CHATTERJEE et al., 2003; KORKMAZ; KOLANKAYA, 2013). Supõe-se que a produção excessiva de NO em resposta ao aumento da iNOS é deletéria à função



renal devido ao excesso de NO que reage com  $O_2^-$  para formar  $ONOO^-$  (KORKMAZ; KOLANKAYA, 2013; MANGGE et al., 2014). Por outro lado, a expressão da eNOS está reduzida na LRA, prejudicando a função renal por causar vasoconstrição (BETZ et al., 2012).

Já foi observado que a Dvl aumentou a ação do NO *in vitro*, promovendo vasorrelaxamento em anéis de aorta de ratos Wistar (BEZERRA et al., 2013). Assim como ocorreu com a Dvl, a *Dioclea rostrata* causou relaxamento em anéis de aorta mediado pelo NO (BEZERRA et al., 2013). Outras lectinas foram capazes de aumentar a produção de NO, porém este efeito foi mediado pela iNOS, estimulando a inflamação (ANDRADE et al., 1999). As lectina de *Canavalia gladiata* estimulou a produção e liberação de NO, que é uma das moléculas responsáveis pelo efeito edematogênico no edema de pata provocado por esta lectina (ASSREUY et al., 2009). A *Canavalia brasiliensis* e *Dioclea grandiflora* aumentaram a produção do NO em células peritoneais após aplicação pela via intraperitoneal e nas patas após injeção local, provocando também o edema de pata (ANDRADE et al., 1999). Em nosso trabalho, a Dvl não aumentou os níveis de NO como visto anteriormente, em vez disso, normalizou os níveis de NO na medula renal dos ratos I/R, indicando que a Dvl pode exercer alguma influência no balanço eNOS/iNOS durante a LRA.

Conforme determinado pela citometria de fluxo, o rim dos ratos I/R apresentaram células apoptóticas, corroborando com outros estudos no mesmo modelo experimental de LRA, tanto em ratos (SI et al., 2014), quanto em camundongos (KUMAR et al., 2009). Este fenômeno também é consistente com a histopatologia da lesão renal aguda em humanos (LEROLLE et al., 2009). Nosso estudo é o primeiro a avaliar os efeitos da Dvl na apoptose *in vivo* quando administrada através da via intravenosa, e observamos que o tratamento com a Dvl foi capaz de reduzir a apoptose inicial e a apoptose tardia nos ratos isquêmicos até os níveis do Sham.

A diferenciação entre as fases iniciais e tardia da apoptose foi possível pois a externalização da fosfatidilserina na célula ocorre no início do processo, antes da membrana celular apresentar sua permeabilidade comprometida, sendo marcada apenas pela anexina V. No estágio tardio de apoptose, as células apresentam a membrana desestruturada e são permeáveis ao iodeto de propídio, sendo marcadas tanto pelo iodeto de propídio, quanto pela anexina V (SUTTON; TCHOUNWOU, 2007).

Quando aplicada por via subcutânea, a Dvl apresenta efeito oposto ao induzir a apoptose em linfonodos de camundongos, além de causar necrose nas vênulas endoteliais altas (BARBOSA et al., 2001). *In vitro*, outras lectinas da subtribo Diocleinae, como *Canavalia Brasiliensis* e *Canavalia ensiformis*, também induziram ao aumento da apoptose em cultura de esplenócitos (SILVA et al., 2011) e em linhagens de células de leucemia humana (FAHEINA-MARTINS et al., 2012). Estes resultados são consistentes com os achados de que a Dvl possui efeito anti-inflamatório quando administrada por via intravenosa e efeito pró-inflamatório após a administração local.

A melhora da apoptose no grupo I/R tratado com Dvl pode estar associada com a diminuição de espécies de oxigênio neste grupo, uma vez que está bem estabelecido que a produção de espécies reativas de oxigênio são capazes de iniciar morte celular nas formas de necrose ou apoptose (LI; JACKSON, 2002).

## 7. SUMÁRIO DE RESULTADOS

**Tabela 6:** Sumário de resultados.

Parâmetro	Sham Dvl vs. Sham VC	IR VC vs. Sham VC	IR Dvl vs. IR VC	IR Dvl vs. Sham VC
<b>TFG</b>	=	↓	↑	↓
<b>FPR</b>	=	↓	↑	↓
<b>FSR</b>	=	↓	↑	↓
<b>RVR</b>	=	↑	↓	=
<b>Proteinúria</b>	=	=	=	=
<b>Uremia</b>	=	↑	↓	=
<b>Creatinina plasmática</b>	=	↑	↓	=
<b>Atividade de MPO</b>	=	↑	↓	=
<b>•O<sub>2</sub><sup>-</sup> córtex</b>	=	=	=	=
<b>•O<sub>2</sub><sup>-</sup> medula</b>	=	↑	↓	↑
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> córtex</b>	=	=	=	=
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> medula</b>	=	↑	↓	=
<b>•OH e ONOO<sup>-</sup> córtex</b>	=	↑	↓	=
<b>•OH e ONOO<sup>-</sup> medula</b>	=	↑	↓	=
<b>NO córtex</b>	=	↑	↓	=
<b>NO medula</b>	=	↑	↓	=
<b>Apoptose</b>	=	↑	↓	=

## 8. CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou, pela primeira vez, que a lectina de *Dioclea violacea* possui efeitos benéficos, tanto funcionalmente, quanto histomorfologicamente, na lesão renal aguda induzida pela técnica de isquemia/reperfusão renal. Esta melhora da função renal parece estar ligada à redução da infiltração de neutrófilos e da apoptose em células renais, bem como com a supressão do estresse oxidativo. Estes achados sugerem que a lectina de *Dioclea violacea* não é tóxica para o rim e poderia ser usada como uma abordagem promissora no tratamento da lesão renal aguda, incluindo as geradas por isquemia/reperfusão.

## 9. REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, P.; RABI, S. Protective effect of aminoguanidine against cyclophosphamide-induced oxidative stress and renal damage in rats. **Redox Report: Communications in Free Radical Research**, v. 16, n. 1, p. 8–14, 2011.
- ALENCAR, N. M. N. et al. Neutrophil-infiltrated paw edema induced by mannose-binding *Dioclea violacea* lectin. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 1, p. 220–225, 2013.
- ANDRADE, J. L. et al. Lectin-induced nitric oxide production. **Cellular Immunology**, v. 194, n. 1, p. 98–102, 1999.
- ANDREOLI, S. P. Reactive oxygen molecules, oxidant injury and renal disease. **Pediatric Nephrology**, v. 5, n. 6, p. 733–742, 1991.
- ASSREUY, A. M. et al. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators of Inflammation**, v. 6, n. 3, p. 201–10, 1997.
- ASSREUY, A. M. S. et al. Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. **The Journal of Urology**, v. 161, n. 6, p. 1988–1993, 1999.
- ASSREUY, A. M. S. et al. Vasodilator effects of Diocleinae lectins from the *Canavalia* genus. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 380, n. 6, p. 509–21, 2009.
- BAGUL, A.; FROST, J. H.; DRAGE, M. Stem cells and their role in renal ischaemia reperfusion injury. **American Journal of Nephrology**, v. 37, n. 1, p. 16–29, 2013.
- BAKER, R. C. et al. Methylprednisolone increases urinary nitrate concentrations and reduces subclinical renal injury during infrarenal aortic ischemia reperfusion. **Annals of Surgery**, v. 244, n. 5, p. 821–826, 2006.
- BARADARAN, A.; NASRI, H.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Oxidative stress and hypertension: possibility of hypertension therapy with antioxidants. **Journal of Research in Medical Science**, v. 19, n. 4, p. 358–367, 2014.
- BARBOSA, T. et al. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 673–678, 2001.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BARROS, E. et al. Insuficiência Renal Aguda. In: FOCHESSATO FILHO, L.; BARROS, E. (Eds.). **Medicina Interna na Prática Clínica**. Porto Alegre - RS: Artmed, 2013. p. 622–633.

BELTOWSKI, J. Hypoxia in the renal medulla: implications for hydrogen sulfide signaling. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 334, n. 2, p. 358–363, 2010.

BETZ, B. et al. Rosiglitazone affects nitric oxide synthases and improves renal outcome in a rat model of severe ischemia/reperfusion injury. **PPAR Research**, v. 2012, p. 219319, 2012.

BEZERRA, M. J. B. et al. Crystal structure of *Dioclea violacea* lectin and a comparative study of vasorelaxant properties with *Dioclea rostrata* lectin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, n. 4, p. 807–15, 2013.

BHALODIA, Y. et al. Renoprotective activity of benincasa cerifera fruit extract on ischemia/reperfusion-induced renal damage in rat. **Iranian Journal of Kidney Diseases**, v. 3, n. 2, p. 80–85, 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRADLEY, P. P. et al. Bradley PP, 1982 - Measurement of cutaneous inflammation - estimation of neutrophil content with an enzyme marker.pdf. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206–209, 1982.

BYWATERS, E. G. L.; BEALL, D. Crush injuries with impairment by of renal function. **Milestones in Nephrology**, v. 9, n. 2, p. 427–432, 1941.

CAMPAGNARO, B. P. et al. DNA damage and augmented oxidative stress in bone marrow mononuclear cells from angiotensin-dependent hypertensive mice. **International Journal of Hypertension**, p. ID 305302, 2013.

CAVADA, B. S. et al. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current Protein & Peptide Science**, v. 2, n. 2, p. 123–135, 2001.

CAVALCANTI, F. C. B. Revisão/atualização em transplante renal: moléculas de adesão na isquemia e no transplante de órgãos. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 19, n. 1, p. 98–104, 1997.

CERQUEIRA, D. DE P.; TAVARES, J. R.; MACHADO, R. C. Fatores preditivos da insuficiência renal e algoritmo de controle e tratamento. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 22, n. 2, p. 211–217, 2014.

CHATTERJEE, P. K. et al. Tempol , a membrane-permeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat. **Kidney International**, v. 58, n. 2, p. 658–673, 2000.

CHATTERJEE, P. K. et al. GW274150, a potent and highly selective inhibitor of iNOS, reduces experimental renal ischemia reperfusion injury. **Kidney International**, v. 63, n. 3, p. 853–865, 2003.

CHERTOW, G. M. et al. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 16, n. 11, p. 3365–3370, 2005.

CHIAZZA, F. et al. A nitric oxide-donor furoxan moiety improves the efficacy of edaravone against early renal dysfunction and injury evoked by ischemia/reperfusion. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. ID 804659, 2015.

DIAS, A. T. et al. Sildenafil ameliorates oxidative stress and DNA damage in the stenotic kidneys in mice with renovascular hypertension. **Journal of Translational Medicine**, v. 12, n. 1, p. 35, 2014.

DOI, K. et al. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 10, p. 2868–2878, 2009.

DUNN, J. S.; MCNEE, J. W. A contribution to the study of war nephritis. **British Medical Journal**, v. 2, n. 2971, p. 745–751, 1917.

EFRATI, S. et al. N-acetylcysteine attenuates NSAID-induced rat renal failure by restoring intrarenal prostaglandin synthesis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 22, n. 7, p. 1873–1881, 2007.

FAHEINA-MARTINS, G. V et al. Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 7, p. 1161–1169, 2012.

FEITOZA, C. Q. et al. Inhibition of COX 1 and 2 prior to renal ischemia/reperfusion injury decreases the development of fibrosis. **Molecular medicine**, v. 14, n. 11-12, p. 724–730, 2008.

FERREYRA, C. et al. Preconditioning with triiodothyronine improves the clinical signs and acute tubular necrosis induced by ischemia/reperfusion in rats. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e74960, 2013.

FOLKMANN, J. K.; LOFT, S.; MØLLER, P. Oxidatively damaged DNA in aging dyslipidemic ApoE<sup>-/-</sup> and wild-type mice. **Mutagenesis**, v. 22, n. 2, p. 105–110, 2007.

FURUICHI, K. et al. Effects of adipose-derived mesenchymal cells on ischemia–reperfusion injury in kidney. **Clinical and Experimental Nephrology**, v. 16, n. 5, p. 679–689, 2012.

GHOSH, J. et al. Acetaminophen induced renal injury via oxidative stress and TNF- $\alpha$  production: therapeutic potential of arjunolic acid. **Toxicology**, v. 268, n. 1-2, p. 8–18, 2010.

GOLDSTEIN, I. J. et al. What should be called a lectin? **Nature**. v.285, p.66, 1980.

HAGAR, H. H.; ABD EL TAWAB, R. Cysteinyl leukotriene receptor antagonism alleviates renal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. **The Journal of Surgical Research**, v. 178, n. 1, p. e25–34, 2012.

HAMMAD, F. T.; AL-SALAM, S.; LUBBAD, L. Does aliskiren protect the kidney following ischemia reperfusion injury? **Physiological Research/Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 62, n. 6, p. 681–690, 2013.

HAVT, A. et al. Renal alterations promoted by the lectins from *Canavalia ensiformis* (ConA) and *Dioclea guianensis* (Dguil) seeds. **Protein and Peptide Letters**, v. 10, n. 2, p. 191–107, 2003.

HERTER, J. M. et al. Integrin activation by P-Rex1 is required for selectin-mediated slow leukocyte rolling and intravascular crawling. **Blood**, v. 121, n. 12, p. 2301–2310, 2013.

HSU, D. et al. Sesame oil prevents acute kidney injury induced by the synergistic action of aminoglycoside and iodinated contrast in rats. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 2532–2536, 2011.

HUANG, L. et al. Overexpression of stanniocalcin-1 inhibits reactive oxygen species and renal ischemia/reperfusion injury in mice. **Kidney International**, v. 82, n. 8, p. 867–877, 2012.

KARAJALA, V.; MANSOUR, W.; KELLUM, J. A. Diuretics in acute kidney injury. **Minerva Anestesiologica**, v. 75, n. 5, p. 251–257, 2009.

KDIGO Clinical Practices Guideline for Acute Kidney Injury. **Official Journal of the International Society of Nephrology - Kidney International Supplements**, v. 2, n. 1, p. 124–138, 2012.

KENNEDY, S. E.; ERLICH, J. H. Murine renal ischaemia-reperfusion injury. **Nephrology**, v. 13, n. 5, p. 390–396, 2008.

KONTOGIANNIS, J.; BURNS, K. D. Role of AT1 angiotensin II receptors in renal ischemic injury. **The American Journal of Physiology**, v. 274, n. 1 Pt 2, p. F79–90, 1998.

KORKMAZ, A.; KOLANKAYA, D. Inhibiting inducible nitric oxide synthase with rutin reduces renal ischemia/reperfusion injury. **Canadian Journal of Surgery**, v. 56, n. 1, p. 6–14, 2013.

KUMAR, S. et al. Dexamethasone ameliorates renal ischemia-reperfusion injury. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, v. 20, n. 11, p. 2412–2425, 2009.

LEROLLE, N. et al. Histopathology of septic shock induced acute kidney injury: apoptosis and leukocytic infiltration. **Intensive Care Medicine**, v. 36, n. 3, p. 471–478, 2009.

LI, C.; JACKSON, R. M. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 282, n. 2, p. C227–C241, 2002.



MAGALHÃES, J. C. G. et al. Renal function in juvenile rats subjected to prenatal malnutrition and chronic salt overload. **Experimental Physiology**, v. 91, n. 3, p. 611–9, 2006.

MALEK, M.; NEMATBAKHS, M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. **Journal of Renal Injury Prevention**, v. 4, n. 2, p. 20–27, 2015.

MAMMADOV, E. et al. Protective effects of phosphodiesterase-4-specific inhibitor rolipram on acute ischemia-reperfusion injury in rat kidney. **Urology**, v. 80, n. 6, p. 1390.e1–6, 2012.

MANGGE, H. et al. Antioxidants, inflammation and cardiovascular disease. **World Journal of Cardiology**, v. 6, n. 6, p. 462–477, 2014.

MASZTALERZ, M. et al. Superoxide anion as a marker of ischemia-reperfusion injury of the transplanted kidney. **Transplantation Proceedings**, v. 38, n. 1, p. 46–48, 2006.

MATTHIJSEN, R. A. et al. Myeloperoxidase is critically involved in the induction of organ damage after renal ischemia reperfusion. **The American Journal of Pathology**, v. 171, n. 6, p. 1743–1752, 2007.

MILORADOVIĆ, Z. et al. Comparative effects of L-arginine and vitamin C pretreatment in SHR with induced postischemic acute renal failure. **General Physiology and Biophysics**, v. 28, n. SPECIAL ISSUE, p. 105–111, 2009.

MONGA, J. et al. Growth inhibition and apoptosis induction by (+)-cyanidan-3-ol in hepatocellular carcinoma. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e68710, 2013.

MONTEIRO TÍNEL, J. M. B. et al. A Lectin from *Dioclea violacea* Interacts with Midgut Surface of *Lutzomyia migonei*, Unlike Its Homologues, *Cratylia floribunda* Lectin and *Canavalia gladiata* Lectin. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 239208, 2014.

MOORE, E. M.; BELLOMO, R.; NICHOL, A. D. The meaning of acute kidney injury and its relevance to intensive care and anaesthesia. **Anaesthesia and Intensive Care**, v. 40, n. 6, p. 929–948, 2012.

NACHTIGALL, I. et al. Standard operating procedures for antibiotic therapy and the occurrence of acute kidney injury: a prospective, clinical, non-interventional, observational study. **Critical Care**, v. 18, n. 3, p. R120, 2014.

NISHIDA, K. et al. Renoprotective effect of long acting thioredoxin by modulating oxidative stress and macrophage migration inhibitory factor against rhabdomyolysis-associated acute kidney injury. **Scientific Reports**, v. 5, n. August, p. 14471, 2015.

NOIRI, E. et al. Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 281, n. 5, p. F948–F957, 2001.

NUNES, B. S. et al. Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 379, n. 6, p. 609–16, 2009.

PICCINNI, P. et al. Prospective multicenter study on epidemiology of acute kidney injury in the ICU: a critical care nephrology Italian collaborative effort (NEFROINT). **Minerva Anestesiologica**, v. 77, n. 11, p. 1072–1083, 2011.

PONCE, D. et al. Injúria renal aguda em unidade de terapia intensiva: Estudo prospectivo sobre a incidência, fatores de risco e mortalidade. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 3, p. 321–326, 2011.

PRICE, P. M.; SAFIRSTEIN, R. L.; MEGYESI, J. The cell cycle and acute kidney injury. **Kidney International**, v. 76, n. 6, p. 604–613, 2009.

PUNDIR, M. et al. Effect of modulating the allosteric sites of N-methyl-D-aspartate receptors in ischemia-reperfusion induced acute kidney injury. **The Journal of Surgical Research**, v. 183, n. 2, p. 668–677, 2013.

RICCI, Z.; RONCO, C. New insights in acute kidney failure in the critically ill. **Swiss Medical Weekly**, v. 142, p. w13662, 2012.

ROCCO, L. et al. Effect of sodium overload on renal function of offspring from diabetic mothers. **Pediatric Nephrology**, v. 23, n. 11, p. 2053–2060, 2008.

SABBAHY, M. EL; VAIDYA, V. S. Ischemic kidney injury and mechanisms of tissue repair. **Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine**, v. 3, n. 5, p. 606–618, 2011.

SCHACHNIK, N. C. C. et al. Intracellular nitric oxide assessment in whole blood leukocytes by flow cytometry: optimization and applicability to monitor patients with chronic graft nephropathy. **Journal of Immunological Methods**, v. 343, n. 2, p. 103–111, 2009.

SECCO, L. M. DAL; CASTILHO, V. Expenditure survey on continued veno-venous hemodialysis procedure in the intensive care unit. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 15, n. 6, p. 1138–1143, 2007.

SEHAJPAL, J. et al. Role of progesterone in melatonin-mediated protection against acute kidney injury. **Journal of Surgical Research**, v. 191, n. 2, p. 441–447, 2014.

SEMEDO, P. et al. Early modulation of inflammation by mesenchymal stem cell after acute kidney injury. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 6, p. 677–682, 2009.

SETSUKINAI, K. et al. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 5, p. 3170–3175, 2003.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R–62R, 2004.

Sl, Y. et al. Dexmedetomidine protects against ischemia/reperfusion injury in rat kidney. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 18, p. 1843–1851, 2014.

SILVA, F. O. et al. Immunostimulatory activity of ConBr: a focus on splenocyte proliferation and proliferative cytokine secretion. **Cell and Tissue Research**, v. 346, n. 2, p. 237–244, 2011.

SILVER, S. A. et al. Risk prediction models for contrast induced nephropathy: systematic review. **BMJ**, p. h4395, 2015.

SINGBARTL, K.; FORLOW, S. B.; LEY, K. Platelet, but not endothelial, P-selectin is critical for neutrophil-mediated acute postischemic renal failure. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 13, p. 2337–2344, 2001.

SINGBARTL, K.; LEY, K. Protection from ischemia-reperfusion induced severe acute renal failure by blocking E-selectin. **Critical Care Medicine**, v. 28, n. 7, p. 2507–2514, 2000.

SINGH, A. P. et al. Animal models of acute renal failure. **Pharmacological Reports**, v. 64, n. 1, p. 31–44, 2012.

SIVARAJAH, A. et al. Agonists of Peroxisome-Proliferator Activated Receptor-Gamma Reduce Renal Ischemia/Reperfusion Injury. **American Journal of Nephrology**, v. 23, n. 4, p. 267–276, 2003.

SONIA, B. N. et al. Perioperative chemotherapy in locally advanced gastric cancer. A retrospective study about 25 cases. **Journal de la Société Tunisienne des Sciences Médicales**, v. 93, n. 4, p. 228–230, 2015.

SUTTON, D. J.; TCHOUNWOU, P. B. Mercury induces the externalization of phosphatidyl-serine in human renal proximal tubule (HK-2) cells. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 4, n. 2, p. 138–144, 2007.

TEIXEIRA, E. H. et al. Renal effects of the lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds. **Protein and Peptide Letters**, v. 8, n. 6, p. 477–484, 2001.

TEIXEIRA, E. H. et al. In vitro inhibition of Streptococci binding to enamel acquired pellicle by plant lectins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 1, p. 111–116, 2006.

TÖGEL, F.; WESTENFELDER, C. Recent advances in the understanding of acute kidney injury. **Prime Reports**, v. 6, n. 83, p. doi: 10.12703/P6–83, 2014.

TONINI, C. L. et al. Effects of aging and hypercholesterolemia on oxidative stress and DNA damage in bone marrow mononuclear cells in apolipoprotein E-deficient mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 2, p. 3325–3342, 2013.

TOTO, R. D. Conventional measurement of renal function utilizing serum creatinine, creatinine clearance, inulin and para-aminohippuric acid clearance. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 4, n. 6, p. 505–509, 1995.

TSUDA, H. et al. Febuxostat suppressed renal ischemia-reperfusion injury via reduced oxidative stress. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 427, n. 2, p. 266–272, 2012.

TUCCI JR., S. et al. Calcium channel blocker and renal mitochondrial function in warm renal ischemia. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 31, n. 4, p. 384–389, 2005.

VELROYEN, A. et al. X-ray phase-contrast tomography of renal ischemia-reperfusion damage. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e109562, 2014.

VIANA, G. S. B. et al. Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the red algae *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kütz. and *B. triquetrum* (S.G. Gmel.) M. Howe. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 6, p. 713–722, 2002.

WANG, P. H. M. et al. Administration of neural precursor cells ameliorates renal ischemia-reperfusion injury. **Nephron. Experimental Nephrology**, v. 112, n. 1, p. e20–28, 2009.

WEINBERG, J. M. The cell biology of ischemic renal injury. **Kidney International**, v. 39, n. 3, p. 476–500, 1991.

WU, H.-H. et al. Ischemic conditioning by short periods of reperfusion attenuates renal ischemia/reperfusion induced apoptosis and autophagy in the rat. **Journal of Biomedical Science**, v. 16, p. 19, 2009.

ZAHARAN, M. H. et al. Sildenafil activates antioxidant and antiapoptotic genes and inhibits proinflammatory cytokine genes in a rat model of renal ischemia/reperfusion injury. **International Urology and Nephrology**, p. 1–9, 2015.

ZOU, C. et al. Pioglitazone protects against renal ischemia-reperfusion injury by enhancing antioxidant capacity. **The Journal of Surgical Research**, v. 13, n. 1, p. 1–4, 2013.